

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 11147892 A

(43) Date of publication of application: 02 . 06 . 99

(51) Int. Cl.

C07F 9/6512

A61K 38/00

A61K 38/00

C07K 5/093

(21) Application number: 10113073

(22) Date of filing: 23 . 04 . 98

(30) Priority: 25 . 04 . 97 JP 09109573
12 . 09 . 97 JP 09248650

(71) Applicant: TAKEDA CHEM IND LTD

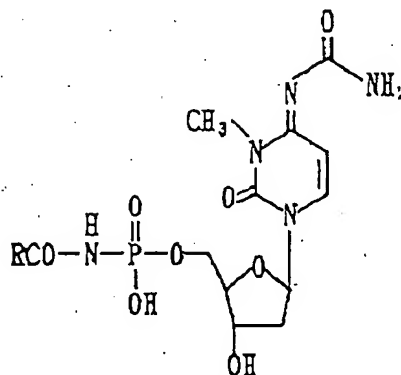
(72) Inventor: MIYAGAWA KENICHIRO
IZAWA MIKIO
NAKAO MASAFUMI
NAKANO YOSHITAKA(54) PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE, ITS
PRODUCTION AND AGENTthe culture solution and collecting the resultant
compound.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)1999,JPO.

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce a new physiologically active substance comprising a physiologically active substance prepared by culturing a specific microorganism belonging to the genus *Bacillus*, manifesting extremely strong antimicrobial activities against bacteria of the genus *Helicobacter* and useful as an anti-*Helicobacter pylori* agent, etc.

SOLUTION: This new physiologically active substance is represented by the formula (RCO is an acyl group) (e.g. 3-methyl-4-N-carbamoyl-2'-deoxycytidine) and is capable of manifesting extremely strong antimicrobial activities against bacteria of the genus *Helicobacter* and useful as an anti-*Helicobacter pylori* agent, etc., for prophylaxis and treatment, etc., of diseases infected with *Helicobacter pylori* such as gastric or duodenal ulcer, gastritis or gastric cancer. The physiologically active substance is obtained by culturing a microorganism belonging to the genus *Bacillus* and having the ability to produce the physiologically active substance [e.g. *Bacillus* sp. HC-62 strain (FERM BP-5929)] in a culture medium, producing and accumulating the compound in



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-147892

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月2日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I
C 0 7 F 9/6512		C 0 7 F 9/6512
A 6 1 K 38/00	A C L	C 0 7 K 5/093
	A D Z	A 6 1 K 37/02
C 0 7 K 5/093		A C L
		A D Z

審査請求 未請求 請求項の数21 O L (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願平10-113073	(71) 出願人	000002934
(22) 出願日	平成10年(1998) 4月23日		武田薬品工業株式会社
(31) 優先権主張番号	特願平9-109573		大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(32) 優先日	平9(1997) 4月25日	(72) 発明者	宮川 権一郎
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		大阪府豊能郡豊能町東ときわ台6丁目6番地の11
(31) 優先権主張番号	特願平9-248650	(72) 発明者	伊澤 幹夫
(32) 優先日	平9(1997) 9月12日		兵庫県尼崎市塚口町1丁目22番1-502号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	中尾 雅文
			奈良県生駒市小瀬町720番地の74
		(72) 発明者	中埜 芳孝
			大阪府摂津市新在家1丁目8番5号
		(74) 代理人	弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

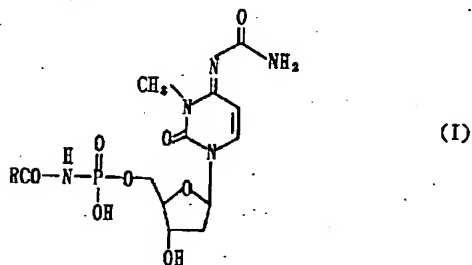
(54) 【発明の名称】 生理活性物質、その製造法及び剤

(57) 【要約】

【課題】ヘリコバクター属菌に対して極めて特異的に強い抗菌性を示す抗ヘリコバクター・ピロリ剤を提供する。

【解決手段】

【化1】

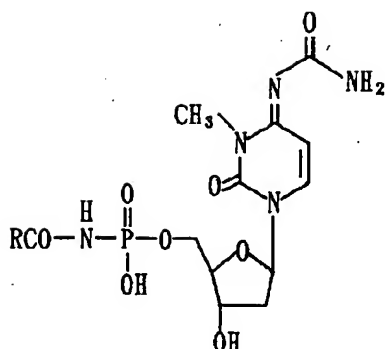


〔式中、RCOはアシル基を示す〕で表される化合物またはその塩、その製造方法および医薬組成物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式

【化1】



(I)

【式中、RCOはアシル基を示す】で表される化合物またはその塩。

【請求項2】RCOが1個ないし複数個連結したアミノ酸残基である請求項1記載の化合物。

【請求項3】アミノ酸残基が蛋白質構成アミノ酸残基である請求項2記載の化合物。

【請求項4】RCOがセリル基である請求項1記載の化合物。

【請求項5】RCOがグルタミンイルグルタミンイルセリル、グルタミンイルグルタミンイルグルタミンイルセリルまたはグルタミンイル- α -グルタミルセリル基である請求項1記載の化合物。

【請求項6】請求項1記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項7】請求項1記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする抗ヘリコバクター・ピロリ剤。

【請求項8】ヘリコバクター・ピロリ感染疾患予防治療剤である請求項7記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤。

【請求項9】ヘリコバクター・ピロリ感染疾患が胃もしくは十二指腸潰瘍、胃炎または胃癌である請求項8記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤。

【請求項10】請求項1記載の化合物またはその塩とそれ以外の抗菌剤とを組み合わせる抗ヘリコバクター・ピロリ剤。

【請求項11】それ以外の抗菌剤がアモキシシリン、クラリスロマイシンおよびメトロニダゾールから選ばれた

1種以上である請求項10記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤。

【請求項12】請求項1記載の化合物またはその塩と潰瘍治療剤とを組み合わせる抗ヘリコバクター・ピロリ剤。

【請求項13】潰瘍治療剤がプロトンポンプインヒビターである請求項12記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤。

【請求項14】プロトンポンプインヒビターがランソプラゾールである請求項13記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤。

【請求項15】バチルス属に属し請求項5記載の化合物を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中に該化合物を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項5記載の化合物の製造法。

【請求項16】微生物がバチルス・メガテリウムである請求項15記載の製造法。

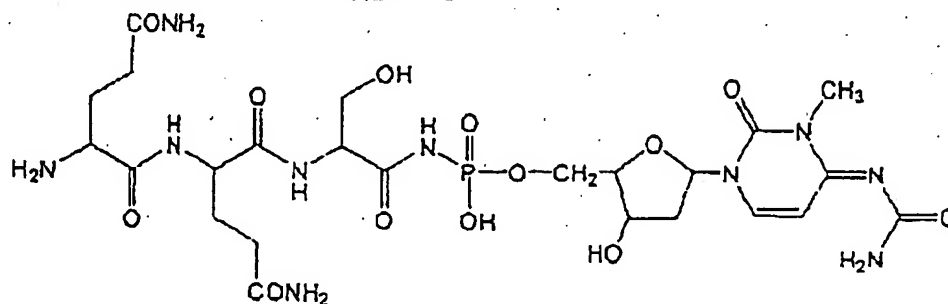
【請求項17】微生物がバチルス・エスピーHC-62株である請求項15記載の製造法。

【請求項18】請求項5記載の化合物の生産能を有するバチルス・メガテリウム。

【請求項19】請求項5記載の化合物の生産能を有するバチルス・エスピーHC-62。

【請求項20】式

【化2】



で表される化合物またはその塩。

【請求項21】次の物理化学的性状を有する化合物HC

-62;

(1) 分子式: C₂₄H₃₉N₁₀O₁₃P

(2) UVスペクトル: 水中の $\lambda_{\max}(\epsilon)$ 、 223 ± 3 nm ($8,900 \pm 1,500$), 277 ± 3 nm ($13,300 \pm 2,000$)

(3) IRスペクトル: KBr錠剤中、主な吸収を示す(波数、 cm^{-1})、3350, 1660, 1570, 1470; 1300, 1230, 1080

(4) ^{13}C -NMRスペクトル: 重水中、以下のシグナルが認められる(125MHz , δppm)、180.5, 179.7, 175.6, 175.5, 172.2, 170.2, 158.3, 154.3, 139.0, 100.3, 89.0, 88.3, 88.2, 74.0, 68.1, 68.1, 63.9, 59.3, 59.2, 56.2, 55.2, 41.7, 33.8, 32.8, 32.5, 29.8, 29.3

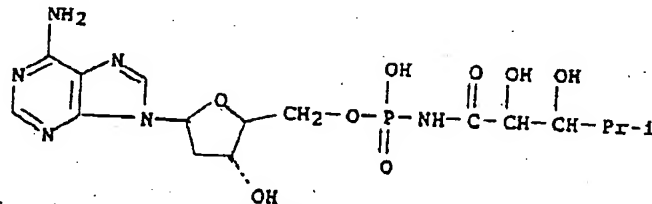
またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

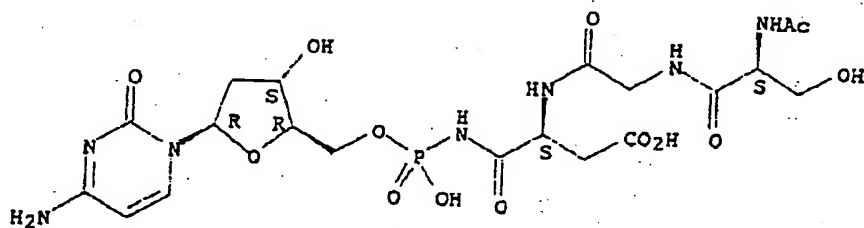
【発明の属する技術分野】本発明は胃、十二指腸潰瘍などの治療剤として有用な生理活性作用を有するHC-62関連化合物及びその塩、およびこれらを含んでなる抗ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)剤に関する。

【0002】



およびヌクレオサイズ・ヌクレオタイズ(Nucleosides Nucleotides, 1995, 14,825)には

【化4】



が開示されておられるが、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)に有効であると記載されていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】今後、より優れた抗ヘリコバクター・ピロリ剤(特に単剤として有効な医薬品)の開発が待たれている。そこで本発明は、単剤で優れた抗菌活性、特にヘリコバクター・ピロリなどのヘリコバクター属菌に対する強い抗菌活性を有し、副作用が少なく臨床上優れた予防治療効果を発揮する新しい医薬を提供するものである。

【0004】

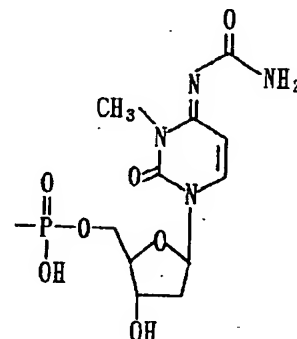
【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題点に鑑み鋭意研究を重ねた結果、微生物培養液より単離された化合物HC-62がヘリコバクター・ピロリに代

【従来の技術】消化管内で有害な作用を及ぼす菌、例えばヘリコバクター・ピロリは、ヘリコバクター(*Helicobacter*)属に属するグラム陰性の微好気性細菌であり、胃炎、十二指腸潰瘍、胃潰瘍等の再発の大きな原因となる可能性が示唆されている。このヘリコバクター・ピロリの感染に起因する各種疾患の治療には、現在、ビスマス製剤と抗生物質の二剤併用や、ビスマス製剤、メトロニダゾール(米国特許第2,944,061号)及びテトラサイクリン(例えば米国特許第2,712,517号)もしくはアモキシシリン(米国特許第3,192,198号)の三剤併用等による化学療法が行われている。プロトンポンプ阻害薬、アモキシシリン及びクラリスロマイシンの三剤を併用することが有効であることが見出されている(*Gut* 1995, 37巻(supplement 1):A365)(*Gastroenterology* 1996, 110巻:A171)。これらビスマス製剤、抗生物質及びメトロニダゾール等は、内服の形で投与されている。また、リン酸アミド類としては、ユーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(*European Journal of Biochemistry*, 1981, 115, 539)には

【化3】

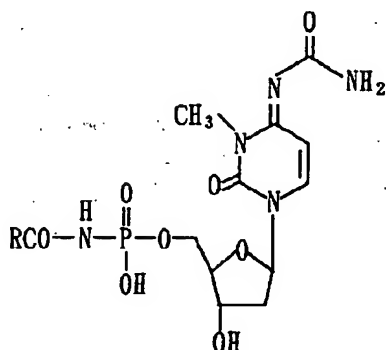
表されるヘリコバクター属細菌に対して極めて特異的に、且つ優れた抗菌作用を有することを見出し、さらに鋭意研究を重ねた結果、窒素原子に特定の基:

【化5】



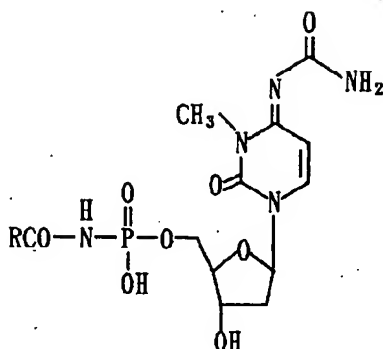
が直接結合していることに化学構造上の特異性を有する一般式

【化6】



〔式中、RCOはアシル基を示す〕で表される新規なリン酸アミド類を始めて合成し、この化合物がその特異な化学構造上に基づいて予想外にも消化管内で有害な作用を及ぼす菌に対して優れた医薬効果特に強い抗ヘリコバクター属菌作用を有していること、さらに副作用が少ない等の臨床上の医薬として優れた性質を有していることを見出し、これらに基づいて本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は(1)一般式

【化7】



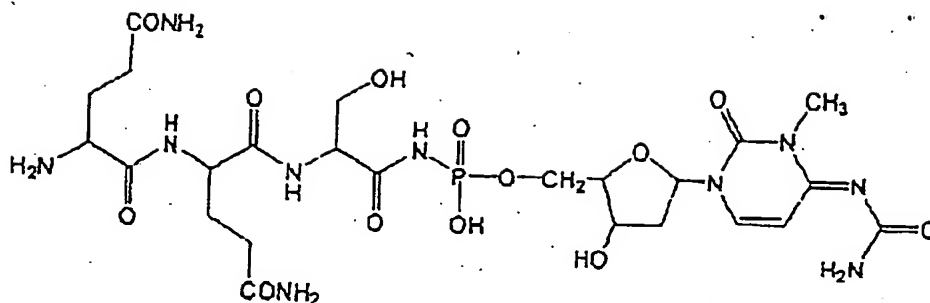
(I)

〔式中、RCOはアシル基を示す〕で表される化合物またはその塩、(2) RCOが1個ないし複数個連結したアミノ酸残基である前記(1)記載の化合物、(3)アミノ酸残基が蛋白質構成アミノ酸残基である前記(2)記載の化合物、(4) RCOがセリル基である前記

(1)記載の化合物、(5) RCOがグルタミルグルタミルセリル、グルタミルグルタミルグルタミルセリルまたはグルタミル- α -グルタミルセリル基である前記(1)記載の化合物、(6)前記(1)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、(7)前記(1)記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする抗ヘリコバクター・ピロリ剤、(8)ヘリコバクター・ピロリ感染疾患予防治療剤である前記(7)記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤、(9)ヘリコバクター・ピロリ感染疾患が胃もしくは十二指腸潰瘍、胃炎または胃癌である前記(8)記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤、(10)前記(1)記載の化合物またはその塩とそれ以外の抗菌剤とを組み合わせる抗ヘリコバクター・ピロリ剤、(11)それ以外の抗菌剤がアモキシシリン、クラリスロマイシンおよびメトロニダゾールから

選ばれた1種以上である前記(10)記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤、(12)前記(1)記載の化合物またはその塩と潰瘍治療剤とを組み合わせる抗ヘリコバクター・ピロリ剤、(13)潰瘍治療剤がプロトンポンプインヒビターである前記(12)記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤、(14)プロトンポンプインヒビターがランソプラゾールである前記(13)記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤、(15)バチルス属に属し前記(5)記載の化合物を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養液中に該化合物を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする前記(5)記載の化合物の製造法、(16)微生物がバチルス・メガテリウムである前記(15)記載の製造法、(17)微生物がバチルス・エスピーHC-62株である前記(15)記載の製造法、(18)前記(5)記載の化合物の生産能を有するバチルス・メガテリウム、(19)前記(5)記載の化合物の生産能を有するバチルス・エスピーHC-62、(20)式

【化8】



で表される化合物またはその塩、

(21) 次の物理化学的性状を有する化合物HC-6 2;

(1) 分子式: $C_{24}H_{39}N_{10}O_{13}P$

(2) UVスペクトル: 水中の $\lambda_{\max}(\epsilon)$ 、 223 ± 3 nm ($8,900 \pm 1,500$), 277 ± 3 nm ($13,300 \pm 2,000$)

(3) IRスペクトル: KBr錠剤中、主な吸収を示す (波数、 cm^{-1})、3350, 1660, 1570, 1470, 1300, 1230, 1080

(4) ^{13}C -NMRスペクトル: 重水中、以下のシグナルが認められる (125MHz , δ ppm)、180.5, 179.7, 175.6, 175.5, 172.2, 170.2, 158.3, 154.3, 139.0, 100.3, 89.0, 88.3, 88.2, 74.0, 68.1, 68.1, 63.9, 59.3, 59.2, 56.2, 55.2, 41.7, 33.8, 32.8, 32.5, 29.8, 29.3

またはその塩に関する。

【0005】RCOの「アシル基」としては、例えば1個ないし複数個連結したアミノ酸残基、置換されていてもよいアルカノイル基、置換されていてもよいアロイル基、置換されていてもよい複素環カルボニル基、置換されていてもよいカルバモイル基、置換されていてもよいチオカルバモイル基、置換されていてもよいアルコキシカルボニル基、置換されていてもよいアリールオキシカルボニル基などが挙げられる。これらの中では、例えば1個ないし複数個連結したアミノ酸残基などが好ましい。1個ないし複数個連結したアミノ酸残基としては、例えば下記のアミノ酸から任意に選ばれる1個ないし20個 (好ましくは8ないし12個、特に好ましくは10個) 連結したものが挙げられる。

【0006】アミノ酸残基におけるアミノ酸とは、カルボン酸の母体構造の水素原子の少なくとも1つがアミノ基に置換された基を総称するものであり、炭素数2ないし20の母体構造を有する α 、 β 、 γ または δ -アミノ酸等が挙げられる。このようなアミノ酸の例としては、 α -アミノ酸が好ましく、例えばアラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、イソロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン等のアミノ酸やその他、ノルバリン、ノルロイシン、2-アミノアジピン酸、2-アミ

ノ酪酸、2-アミノイソ酪酸、1-アミノシクロプロパンカルボン酸、1-アミノシクロペンタンカルボン酸、1-アミノシクロヘキサンカルボン酸、チロニン、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、(2-ナフチル)アラニン、アザグリシン等のアミノ酸等が例示される。1個ないし複数個連結したアミノ酸残基の具体例としては例えば、グルタミニルグルタミニルセリル、グルタミニルグルタミニルグルタミニルセリル、グルタミニル α -グルタミルセリル、グルタミニルセリル、セリル等が挙げられ、グルタミニルグルタミニルセリルが好ましい。

【0007】該「置換されていてもよいアルカノイル基」の「アルカノイル基」としては、例えば C_{1-20} アルカノイル基 (例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、イソプロピオニル、ブチリル、ペンタノイル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、オクタノイル、ノナノイル、ラウロイル、ウンデカノイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイルなど) などが挙げられ、特に C_{1-6} アルカノイル基 (例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、イソプロピオニル、ブチリル、ペンタノイル、ヘキサノイルなど) などが好ましい。該「置換されていてもよいアロイル基」の「アロイル基」としては、例えば C_{7-16} アロイル基 (例えば、ベンゾイル、1-ナフトイル、2-ナフトイルなど) などが挙げられる。該「置換されていてもよい複素環カルボニル基」の「複素環カルボニル基」としては、炭素原子以外にヘテロ原子 (例えば、窒素、酸素、硫黄など) を1ないし4個含む5または6員複素環カルボニル基 (例えば、3-ピロリルカルボニル、2-イミダゾリルカルボニル、1-ピラゾリルカルボニル、3-イソチアゾリルカルボニル、3-イソオキサゾリルカルボニル、ピラジニルカルボニル、2-ピリミジニルカルボニル、3-ピラジニルカルボニル、2-インドリジニルカルボニル、2-イソインドリルカルボニル、1-インドリルカルボニル、2-フロイル、2-テノイル、ニコチニル、イソニコチニル、モルホリノカルボニル、ピペリジノカルボニル、ピペラジノカルボニルなど) などが挙げられる。

【0008】該「置換されていてもよいカルバモイル基」は、カルバモイル基、モノ置換カルバモイル基、ジ置換カルバモイル基を含み、その置換基としては、例えば C_{1-6} アルキル基 (例えば、メチル、エチル、プロピ

ル、イソプロピル、ブチル、イソブチルなど)、 C_{6-14} アリール基(例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチルなど)、 C_{7-16} アラルキル基(例えば、ベンジルなど)、 C_{1-6} アルカノイル基(例えば、アセチル、プロピオニル、イソプロピオニル、ブチリルなど)、 C_{7-16} アロイル基(例えば、ベンゾイル、1-ナフトイル、2-ナフトイルなど)、5または6員の複素環カルボニル基(例えば、3-ピロリルカルボニル、2-イミダゾリルカルボニル、1-ピラゾリルカルボニル、3-イソチアゾリルカルボニル、3-イソオキサゾリルカルボニル、ピラジニルカルボニル、2-ピリミジニルカルボニル、3-ピラジニルカルボニル、2-インドリジニルカルボニル、2-イソインドリルカルボニル、1-インドリルカルボニル、2-フロイル、2-テノイル、ニコチニル、イソニコチニル、モルホリノカルボニル、ピペリジノカルボニル、ピペラジノカルボニルなど)などが挙げられる。該「置換されていてもよいカルバモイル基」の好ましい例としては、例えばモノーまたはジ- C_{1-6} アルカノイル-カルバモイル基(例えば、アセチルカルバモイルなど)などが挙げられる。

【0009】該「置換されていてもよいチオカルバモイル基」は、チオカルバモイル基、モノ置換チオカルバモイル基、ジ置換チオカルバモイル基を含み、その置換基としては、例えば C_{1-6} アルキル基(例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチルなど)、 C_{6-14} アリール基(例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチルなど)、 C_{7-16} アラルキル基(例えば、ベンジルなど)、 C_{1-6} アルカノイル基(例えば、アセチル、プロピオニル、イソプロピオニル、ブチリルなど)、 C_{7-16} アロイル基(例えば、ベンゾイル、1-ナフトイル、2-ナフトイルなど)、5または6員の複素環カルボニル基(例えば、3-ピロリルカルボニル、2-イミダゾリルカルボニル、1-ピラゾリルカルボニル、3-イソチアゾリルカルボニル、3-イソオキサゾリルカルボニル、ピラジニルカルボニル、2-ピリミジニルカルボニル、3-ピラジニルカルボニル、2-インドリジニルカルボニル、2-イソインドリルカルボニル、1-インドリルカルボニル、2-フロイル、2-テノイル、ニコチニル、イソニコチニル、モルホリノカルボニル、ピペリジノカルボニル、ピペラジノカルボニルなど)などが挙げられる。該「置換されていてもよいチオカルバモイル基」の好ましい例としては、例えばモノーまたはジ- C_{1-6} アルカノイル-チオカルバモイル基(例えば、アセチルチオカルバモイルなど)などが挙げられる。

【0010】該「置換されていてもよいアルコキシカルボニル基」の「アルコキシカルボニル基」としては、例えば C_{1-20} アルコキシ-カルボニル基(例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、

イソブトキシカルボニルなど)などが挙げられ、例えば C_{1-6} アルコキシ-カルボニル基(例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニルなど)などが挙げられる。該「置換されていてもよいアリールオキシカルボニル基」の「アリールオキシカルボニル基」とは、 C_{6-14} アリールオキシ-カルボニル基(例えば、フェノキシカルボニル、1-ナフチルオキシカルボニル、2-ナフチルオキシカルボニルなど)などを示す。

【0011】「アシル基」において「アルカノイル基、アロイル基、複素環カルボニル基、アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基」が有していてもよい置換基としては、本発明の目的が達成される限り、特に限定されないが、例えばアミノ基、モノーまたはジ- C_{1-6} アルキルアミノ基(例えば、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノなど)、モノーまたはジ- C_{6-10} アリールアミノ基(例えば、フェニルアミノ、ジフェニルアミノなど)、モノーまたはジ- C_{7-11} アラルキルアミノ基(例えば、ベンジルアミノ、ジベンジルアミノなど)、アジド基、ニトロ基、ハロゲン(例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など)、ヒドロキシル基、 C_{1-6} アルコキシ基(例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシなど)、 C_{6-10} アリールオキシ基(例えば、フェノキシ、1-ナフチルオキシ、2-ナフチルオキシなど)、 C_{7-11} アラルキルオキシ基(例えば、ベンジルオキシなど)、ホルミルオキシ基、 C_{1-6} アルキル-カルボニルオキシ基(例えば、アセトキシ、プロピオニルオキシなど)、 C_{6-10} アリール-カルボニルオキシ基(例えば、ベンゾイルオキシなど)、 C_{7-11} アラルキル-カルボニルオキシ基(例えば、ベンジルカルボニルオキシなど)、スルホニルオキシ基、 C_{1-6} アルキルスルホニルオキシ基(例えば、メチルスルホニルオキシなど)、メルカプト基、 C_{1-6} アルキルチオ基(例えば、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオなど)、 C_{6-10} アリールチオ基(例えば、フェニルチオ、1-ナフチルチオ、2-ナフチルチオなど)、 C_{7-11} アラルキルチオ基(例えば、ベンジルチオなど)、ホスホノオキシ基、シアノ基、カルバモイル基、モノーまたはジ- C_{1-6} アルキルカルバモイル基(例えば、メチルカルバモイル、エチルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイルなど)、モノーまたはジ- C_{6-10} アリールカルバモイル基(例えば、フェニルカルバモイル、ジフェニルカルバモイルなど)、モノーまたはジ- C_{7-11} アラルキルカルバモイル基(例えば、ベンジルカルバモイル、ジベンジルカルバモイルなど)、カルボキシ基、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル基(例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニルなど)、 C_{6-10} アリールオキシ-カルボニル基(例えば、フェノキシカルボニル、1-

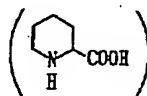
ナフチルオキシカルボニル、2-ナフチルオキシカルボニルなど)、 C_{7-11} アラルキルオキシカルボニル基(例えば、ベンジルオキシカルボニルなど)、ホルミル基、 C_{1-6} アルキルカルボニル基(例えば、アセチル、アロピオニル、イソアロピオニル、ブチリル、ペンタノイル、ヘキサノイルなど)、 C_{6-10} アリールカルボニル基(例えば、ベンゾイル、1-ナフトイル、2-ナフトイルなど)、 C_{7-11} アラルキルカルボニル基(例えば、ベンジルカルボニルなど)、スルホ基、 C_{1-6} アルキルスルフィニル基(例えば、メチルスルフィニル、エチルスルフィニルなど)、 C_{6-10} アリールスルフィニル基(例えば、ベンゼンスルフィニル、1-ナフチルスルフィニル、2-ナフチルスルフィニルなど)、 C_{1-6} アルキルスルホニル基(例えば、メチルスルホニル、エチルスルホニルなど)、 C_{6-10} アリールスルホニル基(例えば、ベンゼンスルホニル、1-ナフチルスルホニル、2-ナフチルスルホニルなど)、 C_{1-6} アルキル基(例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチルなど)、 C_{2-6} アルケニル基(例えば、ビニル、アリル、2-ブテニルなど)、 C_{2-6} アルキニル基(例えば、エチニル、プロパルギルなど)、 C_{3-6} シクロアルキル基(例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど)、 C_{3-6} シクロアルケニル基(例えば、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘキサジエニルなど)、 C_{6-10} アリール基(例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチルなど)、1ないし3環式複素環基(例えば、窒素、酸素、硫黄から選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む5または6員環1ないし3個から形成される複素環基:ピリジル、ピラジル、ピリミジル、キノリル、イソキノリル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、ピリダジニル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピロリル、フリル、ベンゾフラニル、チエニル、ベンゾチエニル、ベンズイミダゾリル、キナゾリル、ピロリジニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリジル、イソインドリジル、モルホリニルなど)、1ないし3環式複素環チオ基(例えば、前記の複素環基にチオ基が結合した基、具体的には、4-ピリジルチオ、2-ピリミジルチオ、1,3,4-チアジアゾール-2-イルチオ、5-テトラゾリルチオ、2-ベンゾチアゾリルチオ、8-キノリルチオなど)などが用いられる。これらの置換基は、前記「アルカノイル基、アロイル基、複素環カルボニル基、アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基」上に化学的に許容される範囲において置換され、この置換基の数は1ないし5、好ましくは1ないし3個である。ただし、置換基の数が2個以上の場合には同一または異なっているもよい。これらの置換基は、化学的に許されるならば、さらに、アミノ基、モノ-または

ジ- C_{1-6} アルキルアミノ基、ニトロ基、ハロゲン、ヒドロキシ基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{1-6} アルキルカルボニルオキシ基、スルホニルオキシ基、 C_{1-6} アルキルスルホニルオキシ基、メルカプト基、 C_{1-6} アルキルチオ基、ホスホノオキシ基、シアノ基、カルバモイル基、モノ-またはジ- C_{1-6} アルキルカルバモイル基、カルボキシ基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、ホルミル基、 C_{1-6} アルキルカルボニル基、スルホ基、 C_{1-6} アルキルスルフィニル基などから選ばれる1ないし3個の置換基で置換されていてもよい。

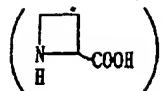
【0012】 RCO は、式 $R^a-R^b-R^c$ 〔 R^a は水素原子または置換されていてもよいアミノ酸残基を、 R^b および R^c は同一または異なって結合手、置換されていてもよいアミノ酸残基または $Y-R^d$ 〔 R^d は置換されていてもよいアミノ酸残基からイミノ基を除いた基を、 Y は $-O-$ 、 $-S-$ または $-NR^e$ 〔 R^e は水素原子または低級アルキル基を示す)を示す)〕で表わされる基で例示することもできる。ここで、 R^a 、 R^b および R^c で示される「アミノ酸残基」および R^d で示される「アミノ酸残基からイミノ基を除いた基」におけるアミノ酸とは、カルボン酸の母体構造の水素原子の少なくとも1つがアミノ基に置換された基を総称するものであり、炭素数2ないし20の母体構造を有する α 、 β 、 γ または δ -アミノ酸等が挙げられる。このようなアミノ酸の例としては、 α -アミノ酸が好ましく、例えばアラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、イソロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン等のアミノ酸やその他、ノルバリン、ノルロイシン、2-アミノアジピン酸、2-アミノ酪酸、2-アミノイソ酪酸、1-アミノシクロアロパンカルボン酸、1-アミノシクロペンタンカルボン酸、1-アミノシクロヘキサンカルボン酸、チロニン、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、(2-ナフチル)アラニン、アザグリシン等のアミノ酸等が例示される。

【0013】また、ここにおけるアミノ酸としては環状イミノ酸も含まれる。「環状イミノ酸」としては、シクロアルカンカルボン酸またはシクロアルケンカルボン酸のメチレン基の少なくとも1つがイミノ基に置換されたものが挙げられ、具体的にはプロリン、ヒドロキシプロリン、3,4-デヒドロプロリン、ピペコリン酸、

【化9】



アジリジンカルボン酸、2-アゼチジンカルボン酸
【化10】



等が挙げられ、例えばプロリン、ヒドロキシプロリンまたはピペコリン酸等が好ましい。そして、本明細書におけるアミノ酸残基は、一般にペプチド化学で用いられているアミノ酸残基であってもよく、前記アミノ酸から導かれるもの等が用いられる。

【0014】R⁴で示される「アミノ酸残基からイミノ基(-NH-)を除いた基」としては、前記したアミノ酸残基よりイミノ基を除いたアシル基等が用いられ、例えば直鎖状または分岐鎖状のC₁₋₁₀アルキル基(例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、オクチル、デシル等)、C₂₋₁₀アルケニル基(例えばビニル、アリル、イソプロベニル、1-プロベニル、2-メチル-1-プロベニル、1-, 2-または3-ブテニル、2-エチル-1-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-, 2-, 3-または4-ペンテニル、4-メチル-3-ペンテニル、1-, 2-, 3-, 4-または5-ヘキセニル、その他特定の位置に二重結合を有するヘプテニル、オクテニル、デセニル等)、C₇₋₂₀アラルキル基(例えばベンジル、フェネチル、3-フェニルプロピル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、9-フルオレニルメチル等)、C₃₋₇シクロアルキル(例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル等)、C₃₋₇シクロアルケニル(例えば2-シクロペンテン-1-イル、3-シクロペンテン-1-イル、2-シクロヘキセン-1-イル、3-シクロヘキセン-1-イル等)、C₆₋₁₅アリール(例えばフェニル、ナフチル、アントリル、フェナントリル、アセナフチレニル、フルオレニル等)、C₃₋₂₀単環式もしくは縮合多環式複素環アラルキル基(例えば4-イミダゾリルメチル、3-ピリジルメチル、4-チアゾリルメチル、3-インドリルメチル、3-キノリルメチル等)等を母体構造として有するカルボン酸より導かれるアシル基等が挙げられる。

【0015】これらのアミノ酸残基およびアミノ酸残基がイミノ基を除いた基は、それぞれ適当な位置に置換基を1個以上好ましくは1ないし3個有していてもよく、それらの置換基としては例えば、アミノ基、アシル置換アミノ基、グアニジノ基、アシルグアニジノ基、アシル

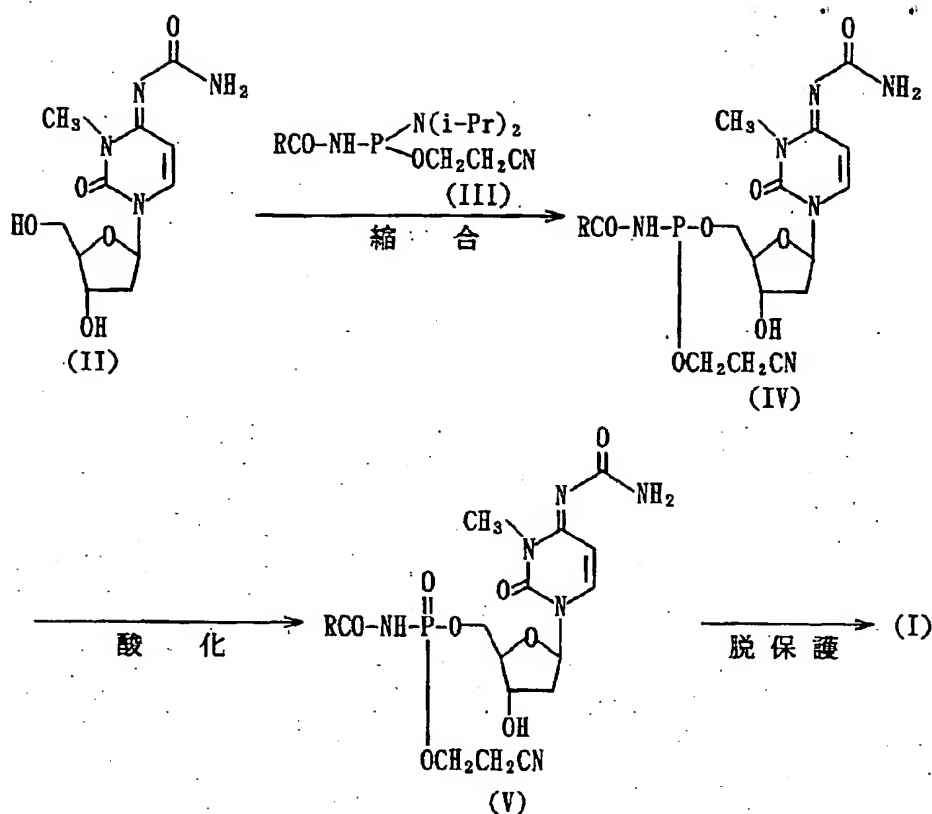
アミノ基、アミジノ基、アシル基、カルバモイル基、N-モノ-またはジ-低級アルキルカルバモイル基、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニルオキシ基、ヒドロキシル基、アシルヒドロキシル基、低級アルコキシ基、フェノキシ基、メルカプト基、アシルメルカプト基、低級アルキルチオ基、フェニルチオ基、スルホ基、シアノ基、アジド基、ニトロ基、ニトロソ基、ハロゲン原子等が挙げられる。ここにおいてアシル置換アミノ基、アシルグアニジノ基、アシルアミジノ基、アシルヒドロキシル基およびアシルメルカプト基における置換基としての「アシル基」としては、前記したRCOの「アシル基」と同様なものが挙げられる。

【0016】「低級アルキルカルバモイル基」の低級アルキル基としては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチルなどのC₁₋₆アルキル基が挙げられる。「低級アルコキシカルボニルオキシ基」としては、例えば、メトキシカルボニルオキシ、エトキシカルボニルオキシ、プロポキシカルボニルオキシ、イソプロポキシカルボニルオキシ、ブトキシカルボニルオキシ、イソブトキシカルボニルオキシ等のC₁₋₆アルコキシ-カルボニルオキシ基等が挙げられる。「低級アルコキシ基」としては、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ等のC₁₋₆アルコキシ基等が挙げられる。「低級アルキルチオ基」としては例えば、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ等のC₁₋₆アルキルチオ基等が挙げられる。R⁶で示される低級アルキル基としては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシルなどのC₁₋₆アルキル基などが挙げられる。

【0017】一般式(I)、(II)、(III)、(IV)及び(V)で表される化合物又はその塩は、それぞれ以下化合物(I)、(II)、(III)、(IV)及び(V)と称することもある。本発明の化合物(I)は、以下に示す反応式の略図(略図中の化合物のi-Prはイソプロピル基を、Rは前記と同意義を示す)に示すとおり例えば化合物(II)と化合物(III)とを縮合させて得られる化合物(IV)を酸化反応に付し、化合物(V)に誘導後、脱保護反応に付すことにより製造することが可能である。原料化合物及び合成中間体は、遊離体のほか化合物

(I)と同様の塩として用いてもよく、また反応混合液のままあるいは公知の手段に従って単離した後に反応に供してもよい。

【化11】



まず、化合物 (II) を化合物 (III) との縮合反応に付すことにより化合物 (IV) を合成することができる。この反応は自体公知の手段、例えばヌクレオサイズ・ヌクレオタイズ (Nucleosides Nucleotides) ., 1995, 14 (3-5), 825 などに記載の手段またはこれらに準じた手段によって行うことができる。式 (II) で表される化合物は、例えば (Bioorganicheskaya Khimiya 1977, 3. (5), 633) に記載された方法に準じて合成できるし、下記の参考例1で述べる微生物を利用する方法で製造することもできる。化合物 (III) は、例えばヌクレオサイズ・ヌクレオタイズ (Nucleosides nucleotides) ., 1995, 14 (3-5), 825 に記載された方法に準じて合成できる。ついで、化合物 (IV) を酸化反応に付すことにより、化合物 (V) に誘導後、塩基性条件下で脱保護反応に付すことにより化合物 (I) を合成することができる。この酸化反応及び脱保護反応は自体公知の方法、例えばヌクレオサイズ・ヌクレオタイズ (Nucleosides Nucleotides) ., 1995, 14 (3-5), 825 などに記載の方法またはこれらに準じた方法によって行うことができる。酸化剤としては、反応が進行する限り特に限定されないが、例えば *tert*-ブチルヒドロペルオキシドが用いられる。脱保護反応における塩基としては、反応が進行する限り特に限定されないが、例えばアンモニア等が用いられる。【0018】式 $\text{R}^a\text{-R}^b\text{-R}^c$ において R^a 、 R^b 、 R^c の各ユニット間の結合がアミド結合あるいはエステル結

合のいずれの場合においても、他の官能基が適当な保護基により保護されていてもよい R^d のカルボン酸を活性化し、これともう一方の適当な保護基により保護されていてもよいアミンあるいはアルコール化合物とを縮合する事ができる。上記反応におけるカルボン酸の反応性誘導体は、例えば 酸ハロゲン化物法、アジド法、混合酸無水物法 (“他の酸” として塩化イソブチルオキシカルボニルや塩化ピバル酸等が用いられる)、対称酸無水物法、さらには縮合剤として N,N' -カルボジイミダゾール、 N,N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド、 N,N' -ジイソプロピルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド、 N -エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン、ジエチル ホスホロシアニダート、ジフェニル ホスホリルアジド、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・テトラフルオロボレート、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノ-ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート、プロモトリス-ピロリジノ-ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート、2-(5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド)-テトラメチルウロニウム テトラフル

オロブレイト等を用いる方法、また4-ジメチルアミノピリジン、3-ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール等の存在下に上記縮合剤を作用させる方法、もしくはこれらを用いた活性エステル法等を用いることにより、製造することができる。

【0019】上記反応は、通常、溶媒中で、カルボン酸の反応性誘導体に対してアミンあるいはアルコール化合物を0.5ないし1.0モル当量用いて行われる。溶媒としては、例えばベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、例えばジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、例えばヘキサン、ヘプタン、シクロヘキサン等の飽和炭化水素類、例えばジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類、例えばアセトニトリル等のニトリル類、例えばジメチルスルホキシド等のスルホキシド類、例えばN,N-ジメチルホルムアミド等の酸アミド類、例えば酢酸エチル等のエステル類等または水が用いられる。これらの溶媒は単独で用いることもできるし、また必要に応じて二種またはそれ以上の多種類を適当な割合、例えば1:1ないし1:10の割合で混合して用いてもよい。反応温度は、通常-80ないし100℃、好ましくは-50ないし50℃程度である。反応時間は、1ないし96時間、好ましくは1ないし72時間程度である。縮合反応の後には必要ならば精製操作を経て部分的に保護基を除去し、次の同様の縮合反応に付すこともできるし、得られた縮合生成物が保護された最終目的物の場合は全保護基を除去し、必要な場合は精製して純粋な目的物を得る事ができる。上記の一連の合成反応で用いられる種々のアミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、カルボニル基等の保護基としては下記のようなものを用いることができる。

【0020】アミノ基の保護基としては、例えばホルミル、アセチル、クロロアセチル、ジクロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、アセトアセチル、o-ニトロフェニルアセチル等のアミドを形成するタイプの保護基；例えばtert-ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル、p-ニトロベンジルオキシカルボニル、2-クロロベンジルオキシカルボニル、2,4-ジクロロベンジルオキシカルボニル、ベンズヒドリルオキシカルボニル、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル、2-トリメチルシリルエトキシカルボニル、1-メチル-1-(4-ビフェニル)エトキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニル、9-アントリルメトキシカルボニル、イソニコチニルオキシカルボニル、1-アダマンチルオキシカルボニル等のカルバメートを形成するタイプの保護基；ならびにトリチル、フタロイル

等が挙げられる。

【0021】水酸基の保護基としては、例えばメトキシメチル、ベンジルオキシメチル、tert-ブトキシメチル、2-メトキシエトキシメチル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル、メチルチオメチル、2-テトラヒドロピラニル、4-メトキシ-4-テトラヒドロピラニル、2-テトラヒドロピラニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、p-ニトロベンジル、o-ニトロベンジル、2,6-ジクロロベンジル、トリチル等のエーテルを形成するタイプの保護基；例えばトリメチルシリル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、イソプロピルジメチルシリル、ジエチルイソプロピルシリル、tert-ブチルジメチルシリル、tert-ブチルジフェニルシリル、トリベンジルシリル、トリフェニルシリル、メチルジフェニルシリル等のシリルエーテルを形成するタイプの保護基；例えばホルミル、アセチル、クロロアセチル、ジクロロアセチル、トリクロロアセチル、ビバロイル、ベンゾイル、ベンジルオキシカルボニル、2-ブロモベンジルオキシカルボニル等のエステルを形成するタイプの保護基等が挙げられる。カルボキシル基の保護基の好適な例としては、例えばメチル、エチル、メトキシメチル、メトキシエトキシメチル、ベンジルオキシメチル、tert-ブチル、ベンジル、p-メトキシベンジル、p-ニトロベンジル、o-ニトロベンジル、ベンズヒドリル、トリチル、2,2,2-トリクロロエチル、2-トリメチルシリルエチル、アリル、シクロヘキシル、シクロペンチル、フェナシル等のエステルを形成するタイプの保護基；例えばトリメチルシリル、トリエチルシリル、tert-ブチルジメチルシリル、イソプロピルジメチルシリル、ジメチルフェニルシリル等のシリルエステルを形成するタイプの保護基等が挙げられる。

【0022】カルボニル基の保護基としては、例えばジメチル、ジエチル、ジベンジル、ジアセチル等のアセタールやケタール、もしくはジチオアセタールやジチオケタールを形成するタイプの保護基；置換されていてもよい1,3-ジオキサン、1,3-ジオキソラン類を形成するタイプや1,3-ジチアンや1,3-ジチオランを形成するタイプ、さらには、N,N-ジメチル、2,4-ジニトロフェニル等の置換ヒドラゾン形成するタイプの保護基等が挙げられる。これらのアミノ基の保護基、水酸基の保護基、カルボニル基の保護基およびカルボキシル基の保護基を除去する方法としては、例えば酸による方法、塩基による方法、還元による方法、紫外線による方法、ヒドラジンによる方法、フェニルヒドラジンによる方法、N-メチルジチオカルバミン酸ナトリウムによる方法、テトラブチルアンモニウムフルオリドによる方法、酢酸パラジウムによる方法、塩化水銀による方法、ルイス酸による方法等が挙げられ、これら一般的な方法あるいはその他の公知の手段を適宜選択して用いることができる。ここで、酸による方法は、アミド、エステル、シ

リルエステル、シリルエーテル等を加水分解する一般的な方法の一つであり、対応する保護基の脱離に適用される。例えばtert-ブトキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル、ベンズヒドリルオキシカルボニル、9-アントリルメトキシカルボニル、1-メチル-1-(4-ビフェニル)エトキシカルボニル、ダマンチルオキシカルボニル、トリチル等で保護されたアミノ基；例えばメトキシメチル、tert-ブトキシメチル、2-テトラヒドロピラニル、4-メトキシ-4-テトラヒドロピラニル、2-テトラヒドロフラニル、トリチル等で保護されたヒドロキシル基等の脱保護にも適用される。使用される酸の好適な例としては、例えばギ酸、トリフルオロ酢酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸；例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸等の無機酸等が挙げられる。

【0023】塩基による方法は、酸による方法と同様にアミド、エステル等を加水分解する一般的な方法の一つであり、対応する保護基の脱離に適用される。例えば、9-フルオレニルメトキシカルボニルで保護されたアミノ基の脱保護には有機塩基類が有効に用いられる。使用される塩基の好適な例としては、例えば水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の水酸化アルカリ金属、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム等の水酸化アルカリ土類金属、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の炭酸アルカリ金属、炭酸マグネシウム、炭酸カルシウム等の炭酸アルカリ土類金属、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等の炭酸水素アルカリ金属、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等の酢酸アルカリ金属、リン酸カルシウム、リン酸マグネシウム等のリン酸アルカリ土類金属、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二カリウム等のリン酸水素アルカリ金属ならびにアンモニア水等の無機塩基；例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、ピコリン、N-メチルピロリジン、ピペリジン、N-メチルピペリジン、N-メチルモルホリン、1,5-ジアザビシクロ〔4.3.0〕ノン-5-エン、1,4-ジアザビシクロ〔2.2.2〕オクタン、1,8-ジアザビシクロ〔5.4.0〕-7-ウンデセン等の有機塩基等が挙げられる。

【0024】還元による方法は、例えばトリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、o-ニトロフェニルアセチル、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル、p-ニトロベンジルオキシカルボニル、2,4-ジクロロベンジルオキシカルボニル、イソニコチニルオキシカルボニル、トリチル等で保護されたアミノ基；例えばベンジル、p-ニトロベンジル等で保護されたヒドロキシル基；例えばベンジルオキシメチル、ベンジル、p-ニトロベンジル、フェナシル、2,2,2-トリクロロエチル、ベンズヒドリル等で保護されたカルボキシル基等の脱保護に適用される。使用さ

れる還元法の好適な例としては、例えば水素化ホウ素ナトリウムによる還元、亜鉛/酢酸による還元、接触還元等が挙げられる。紫外線による方法は、例えばo-ニトロベンジルで保護されたヒドロキシル基ならびにカルボキシル基の脱保護に用いられる。ヒドラジンによる方法は、例えばフタロイルで保護されたアミノ基（例えばフタリミド基等）の脱保護に用いられる。フェニルヒドラジンによる方法は、例えばアセトアセチルで保護されたアミノ基の脱保護に用いられる。

【0025】N-メチルジチオカルバミン酸ナトリウムによる方法は、例えばクロロアセチルで保護されたアミノ基ならびにヒドロキシル基の脱保護に用いられる。テトラブチルアンモニウムフルオリドによる方法は、例えば2-トリメチルシリルエチルカルバメート、シリルエーテル類ならびにシリルエステル類から保護基を除去し、それぞれアミノ基、ヒドロキシル基ならびにカルボキシル基を得る方法として用いられる。酢酸パラジウムによる方法は、例えばアリルエステルから保護基を除去してカルボキシル基を得る方法として用いられる。塩化水銀による方法は、例えばメチルチオメチルで保護されたヒドロキシル基の脱保護に用いられる。ルイス酸による方法は、例えば2-メトキシエトキシメチルで保護されたヒドロキシル基の脱保護に用いられる。使用されるルイス酸の好適な例としては、例えば臭化亜鉛、四塩化チタン等が挙げられる。また上記した一連の反応で得られる、中間体、生成物、最終生成物は、必要に応じて、公知のあるいはそれに準ずる分離精製手段、例えば濃縮、減圧濃縮、溶媒抽出、晶出、再結晶、転溶、クロマトグラフィー等により単離精製することができる。また、本発明化合物(I)（以下「HC-62類」と称することもある）は例えば微生物を利用する以下の方法で製造することもできる。

【0026】本製造法において用いられる微生物としては、たとえば日本国福井県の土壌から分離したバチルス・エスピーHC-62株(Bacillus sp. HC-62；以下「HC-62株」と称することもある）があげられる。HC-62株の分類学的性状について、常法に従って調べたところ、本菌は好気性のグラム陽性の運動性桿菌で、細胞の大きさは $1.2 \times 4.3 \sim 7.1 \mu\text{m}$ であった。内性胞子形成が認められ、胞子の形状は楕円形、形成部位は細胞の中央で胞子嚢の膨張は認められなかった。本菌の化学分類学的性状としては細胞壁ジアミノピメリン酸として meso-ジアミノピメリン酸(meso-DAP)を含み、キノン系はメナキノン-7(MK-7)であり、DNAのG+C含量は36.5 mol%であった。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2の分類基準から本菌はバチルス属に属する微生物(Bacillus sp.)と同定された。さらに、HC-62株は絶対好気的に増殖し、細胞が比較的大きく、内生胞子は楕円形で、DNAのG+C含量が36.5 mol%と高く、肉

汁寒天培地で旺盛に増殖し、カゼイン、ゲラチンおよび澱粉分解能が陽性であったことから、本菌は(バチルス・メガテリウム) *Bacillus megaterium* と同定された。Bergey's Manual において、*B. megaterium* はDNAの相同性および生理・生化学的性状から4グループに分けられている。HC-62株は、*B. megaterium*の基準株が含まれ、狭義の *B. megaterium* とされている Group-Aの性状と一致した。現在は *Bacillus simplex* Priest et al. とされている Group-Bとは *B. simplex* の細胞の幅は0.8~1.0 μm であるのに比べて大きいこと、チロシン培地で褐色色素を生成しないこと、および同種のG+C含量(40~41%)に比べて低い点において、*Bacillus flexus* Priest et al. とされている Group-Cとは細胞がおおきいこと、および菌体脂肪酸組成から区別された。Group-Dの現在の分類学的位置は、明らかにされていないが、同グループのG+C含量は34%と低い点から明確に区別される。従って、HC-62株は現在の分類基準に照らし合わせても *B. megaterium* と同定された。上記バチルス・エスピーHC-62株は財団法人発酵研究所に平成9年4月18日から寄託番号IFO-16077として寄託されており、又本微生物は、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH、日本国茨城県つくば市谷田部町東1丁目1番3号)に平成9年4月24日から寄託番号FERMBP-5929として寄託されている。上記のとおりバチルス・エスピーHC-62株はバチルス・メガテリウムと同定された。バチルス属菌は、微生物の一般的性質として自然的または変異剤によって変異を起こし得る。例えば、X線、ガンマ線、紫外線等の放射線の照射、種々の薬剤による処理または薬剤を含有する培地上での培養、その他の手段で変異させて得られる多くの変異株、あるいは自然的に得られる突然変異株であっても、化合物HC-62類を生産する性質を有するものはすべて本発明の方法に利用し得る。

【0027】本発明方法の培養に用いられる培地は用いられる菌株が利用し得る栄養源を含むものなら、液状でも固状でもよいが、大量に処理するときには液体培地を用いるのがより適当である。培地には同化し得る栄養源、消化し得る窒素源、無機物質、微量栄養素を適宜配合される。炭素源としては、たとえばブドウ糖、乳糖、ショ糖、麦芽糖、デキストリン、でん粉、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、油脂類(例、大豆油、オリーブ油、ヌカ油、ゴマ油、ラード油、チキン油など)、窒素源としては、たとえば肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、大豆粉、コーン・スチープ・リカー、ペプトン、綿実粉、蔗糖蜜、尿素、アンモニウム塩類(例、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなど)その他が用いられる。さらにナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む塩類、鉄、マンガン、亜鉛、コバル

ト、ニッケルなどの金属塩、りん酸、ホウ酸などの塩類や酢酸、プロピオン酸などの有機酸の塩類が適宜用いられる。その他、アミノ酸(例、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、リジン、バリン、メチオニン、プロリン等)、ビタミン類(例、 B_1 、 B_2 、ニコチン酸、 B_{12} 、C等)、核酸類(例、プリン、ピリミジンおよびその誘導体)等を含有させてもよい。もちろん培地のpHを調節する目的で無機または有機の酸、アルカリ類、緩衝剤等を加え、あるいは消泡の目的で油脂類、表面活性剤等の適量を添加される。

【0028】培養の手段は静置培養も、振盪培養あるいは通気攪拌培養等の適宜の手段を選択し得る。大量の処理には、いわゆる深部通気攪拌培養によるのが望ましいことはいうまでもない。培養の条件は培地の状態、組成、菌株の種類、培養の手段によって一定しないのは当然であるが、それらは通常15℃~37℃の温度で、初発pH約5~9付近に選択するのがよい。とりわけ、培養中期の温度は20℃~30℃、また初発pHは約6~8の条件が望ましい。培養時期も前記の諸条件により一定しないが、該目的化合物濃度が最大となるまで培養するのがよい。これに要する時間は液体培地を用いる振盪培養または通気攪拌培養の場合は通常約1~10日間程度である。生成した化合物HC-62類は、その化学的性質に従って培養物から抽出、精製することが可能である。培養物から目的とする化合物HC-62類を採取するには、微生物の生産する代謝物をその微生物培養物から採取するのに通常使用される分離手段が適宜利用される。例えばHC-62類は水溶性両性物質の性質を示し、主として培養上清中に含まれるので、まず培養液からろ過あるいは遠心分離によって菌体を除去する。

【0029】得られた培養上清液をさらに精製し、純粋なHC-62類を得るには周知の種々のクロマトグラフィー法が有利に用いられる。クロマトグラフィーの担体としては活性炭(例、クロマト用活性炭または粒状白炭(武田薬品工業社製)等)、吸着性樹脂(例、ダイヤイオンHP-20またはSP-207(三菱化学社製)、アンバーライトXAD-IまたはII(ローム・アンド・ハース社製、米国)等)、微結晶セルロース(例、アビセル(旭化成社製)、フナセル(フナコシ株式会社製)等)、シリカゲル(例、キーゼルゲル60(メルク社製、ドイツ)等)など化合物の吸着性の差を利用するもの、または陽イオン交換樹脂(例、アンバーライトIR-120、IRC-50またはCG-50(ローム・アンド・ハース社製、米国)、ダウエックス50W(ダウ・ケミカル社製、米国)、ダイヤイオンSK1A(三菱化学社製)等)、陰イオン交換樹脂(例、アンバーライトIRA-402、IRA-67またはIRA-68(ローム・アンド・ハース社製、米国)、ダウエックス1(ダウ・ケミカル社製、米国)、ダイヤイオンSA10B、PA-404またはWA-30(三菱

化学社製)等)、イオン交換セルロース〔CM-セルロース(ファルマシア社製、スウェーデン)等)、イオン交換セファデックス〔例、QAEまたはCM-セファデックス(ファルマシア社製、スウェーデン)等〕など化合物の官能基の差を利用するもの、あるいは分子ふるい性担体〔例、セファデックスG-10またはLH-20(ファルマシア社製、スウェーデン)等〕など化合物の分子量の差を利用するもの等が有利に用いられる。クロマトグラフィーに用いる溶媒としては、担体の種類、性質によって組み合わせが異なるが、例えば水、アルカリ(例、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸水素ナトリウム、アンモニア等)含有水溶液、酸(例、塩酸、硫酸、酢酸、ギ酸、リン酸等)含有水溶液、塩類含有水溶液(例、食塩水、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液等)および水と混和し得る有機溶媒(例、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、アセトン、アセトニトリル等)などの単独あるいは適宜の割合の混合溶媒が用いられる。

【0030】さらに、本発明においては目的化合物を精製する場合に分取用高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法も有利に用いられる。この方法を適用する場合、担体としてはオクタデシルシラン(ODS)系、ポリマー系およびシリカゲル系のものが有利に用いられる。例えばODS系の場合、YMCゲル(ワイエムシ社製)あるいはTSKゲル(東ソー社製)などが、ポリマー系の場合、ポリマーにオクタデシル基を導入したODP(旭化成社製)あるいはポリマーにポリアミンを導入したNH2P(旭化成社製)などが用いられる。移動相としては水、酸含有水溶液、塩類含有水溶液、メタノール、アセトニトリルなどの単独あるいは適宜の割合の混合溶液が有利に用いられる。後述する実施例2で得られた化合物1(HC-62)の物理化学的性質を以下に示す。

- 【0031】1) 外観：白色粉末
 2) 比旋光度： -2.6° ($c=0.65$ 、水、 21°C)
 3) 分子量：FAB-マスマスペクトル； m/z 707 ($M+H$)⁺
 4) 元素分析値：(%) (水分2モルとして計算)
 実測値；C, 38.97；H, 5.56；N, 18.89；P, 3.94
 計算値；C, 38.82；H, 5.84；N,

18.86；P, 4.17

5) 分子式： $C_{24}H_{39}N_{10}O_{13}P$

6) UVスペクトル： $\lambda_{\max}(\epsilon)$

水中；223 nm (8,900), 277 nm (13,300)

0.1N塩酸中；235 nm (9,100), 303 nm (17,200)

0.1N水酸化ナトリウム水中；278 nm (13,300)

7) IRスペクトル：KBr錠剤中、主な吸収を示す(波数、 cm^{-1} 、図1)。

3350, 1660, 1570, 1470, 1300, 1230, 1080

8) ^{13}C -NMRスペクトル：重水中、以下のシグナルが認められる。

(125 MHz、 δ ppm 図2)

180.5, 179.7, 175.6, 175.5, 172.2, 170.2, 158.3, 1

54.3, 139.0, 100.3, 89.0, 88.3, 88.2, 74.0, 68.1,

68.1, 63.9, 59.3, 59.2, 56.2, 55.2, 41.7, 33.8, 32.

8, 32.5, 29.8, 29.3

9) アミノ酸分析：6N塩酸(4%チオグリコール酸含有)中、 110°C で24時間加水分解後、分析。

グルタミン酸(2モル)、セリン(1モル)

10) 呈色反応：

陽性；ニンヒドリン、リンモリブデン酸反応

陰性；エールリッヒ、坂口反応

11) 溶解性：

可溶；水、ジメチルスルホキシド

難溶；ジエチルエーテル、アセトン

12) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)：

カラム；YMC-Pack ODS-A, A-312, 150×6.0 mm (ワイエムシ社製)

移動相；4%(v/v)アセトニトリル/0.05Mリン酸緩衝液(pH3)

流速；1.0 ml/分

検出法；UV吸収、214 nm

保持時間；5.0分

13) 薄層クロマトグラフィー(TLC)：

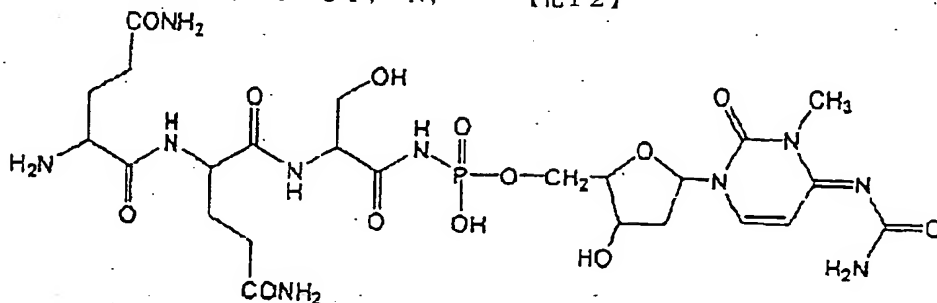
担体；シリカゲル60F₂₅₄、0.25 mm (メルク社製、ドイツ)

展開溶媒；アセトニトリル/水(3:2)

R_f値；0.37

【0032】化合物1(HC-62)の構造式は下記の通りである。

【化12】

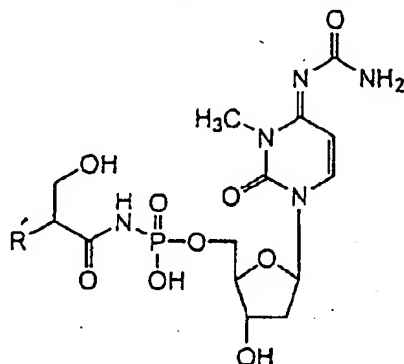


一般式 (I) において RCO がセリル基である化合物またはその塩は、一般式 (I) において RCO がグルタミルグルタミルセリル、グルタミルグルタミルグルタミルセリル基、グルタミル- α -グルタミルセリル基である化合物またはその塩を酵素と反応させることにより製造することができる。用いられる酵素としては、例えばエキソペプチダーゼ (例、ロイシンアミノペプチダーゼ等)、蛋白分解酵素 (例、アクチナーゼ E (科研製薬社製) 等) などが挙げられる。反応は、通常水溶液中で行われ、pH を調整する目的で無機または有機の酸またはアルカリ類、緩衝剤などを加えても差し支えない。反応温度は、酵素反応が進行する限り特に限定されないが、通常約 10℃ ないし 50℃、好ましくは 2

0℃ ないし 40℃ で行われる。反応時間は、用いられる酵素の種類および量、反応温度、溶液の pH などにより異なるが、通常数分から数十時間反応させる。一般式 (I) において、RCO がグルタミルセリン基である化合物またはその塩は、一般式 (I) において RCO がグルタミルグルタミルセリン、グルタミルグルタミルグルタミルセリン基である化合物またはその塩を酵素と反応させることにより製造することができる。用いられる酵素および反応条件は、上述の酵素反応と同様である。

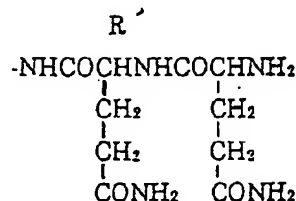
【0033】後述する実施例で得られる化合物の構造式は下記の通りである。

【化13】

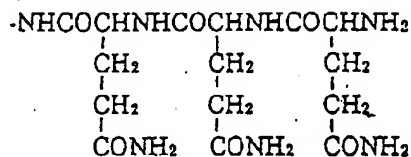


化合物番号

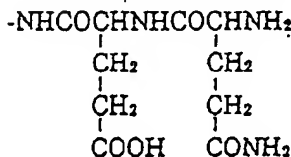
1



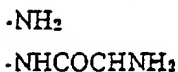
2



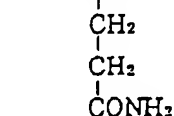
3



4



5



【0034】本発明の化合物 (I) の塩としては薬理的に許容しうる塩基付加塩または酸付加塩があげられる。塩基付加塩としては、例えばアルカリ金属 (例、ナ

トリウム、カリウム等) との塩あるいはアルカリ土類金属 (例、カルシウム、マグネシウム等) との塩などが挙げられる。酸付加塩としては、例えば無機酸 (例、塩

酸、臭化水素、ヨウ化水素、硫酸、リン酸等)との塩あるいは有機酸(例、酢酸、プロピオン酸、乳酸、コハク酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、グルコン酸、アスコルビン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ケイ皮酸、フマル酸、リンゴ酸、シュウ酸等)との塩などが挙げられる。また、一般式(1)で表される化合物またはその水和物および非水和物も本発明の範囲に包含されるものである。

【0035】本発明の化合物(1)は、自体公知の手段、例えば、溶媒抽出、液性変換、転溶、晶出、再結晶、クロマトグラフィーなどによって単離、精製することができる。また、本発明の化合物(1)の原料化合物またはその塩は、前記と同様の公知の手段などによって単離、精製することができるが、単離することなくそのまま反応混合物として次の工程の原料として供されてもよい。本発明の化合物(1)が、光学異性体、立体異性体、位置異性体または回転異性体を含有する場合には、これらも本発明の化合物に包含されるとともに、自体公知の合成手法、分離手法によりそれぞれ単品として得ることができる。例えば、本発明の化合物に光学異性体が存在する場合には、該化合物から分割された光学異性体も本発明に包含される。光学異性体は自体公知の方法により製造することができる。具体的には、光学活性な合成中間体を用いるかもしくは最終物のラセミ体の混合物を常法に従って光学分割することにより光学異性体を得る。光学分割法としては、自体公知の方法、例えば、下記の分別再結晶法、キラルカラム法、ジアステレオマー法などが用いられる。

【0036】(1) 分別再結晶法

ラセミ体と光学活性な化合物とで塩を形成させ、これを分別再結晶法によって分離し、所望により、中和工程を経てフリーの光学異性体を得る方法。

(2) キラルカラム法

ラセミ体またはその塩を光学異性体分離用カラム(キラルカラム)にかけて分離する方法。例えば、液体クロマトグラフィーの場合、ENANTIO-OVM(トーソー社製)などのキラルカラムに光学異性体の混合物を添加し、水、種々の緩衝液(例、リン酸緩衝液など)、有機溶媒(例、エタノール、メタノール、アセトニトリルなど)を単独あるいは混合した溶液として展開させることにより、光学異性体を分離する。また、例えば、ガスクロマトグラフィーの場合、CP-Chirasil-DeXCB(ジーエルサイエンス社製)などのキラルカラムを使用して分離する。

(3) ジアステレオマー法

ラセミ体の混合物を光学活性な試薬と化学反応によってジアステレオマーの混合物とし、これを通常の分離手段(例えば、分別再結晶、クロマトグラフィー法など)などを経て単一物質とした後、加水分解反応などの化学的な処理により光学活性な試薬部位を切り離すことにより

光学異性体を得る方法。例えば、本発明の化合物が分子内に水酸基または1ないし2級アミノ基を有する場合、該化合物と光学活性な有機酸(例えば、MTPA[α -メトキシ- α -(トリフルオロメチル)フェニル酢酸]、(-)-メントキシ酢酸など)などを縮合反応に付すことにより、それぞれエステル体またはアミド体のジアステレオマーが得られる。一方、本発明の化合物がカルボン酸を有する場合、該化合物と光学活性アミンまたはアルコール試薬とを縮合反応に付すことにより、それぞれアミド体またはエステル体のジアステレオマーが得られる。分離されたジアステレオマーは、酸加水分解あるいは塩基性加水分解反応に付すことにより、もとの化合物の光学異性体に変換される。

【0037】本発明の化合物(1)は、新規物質であり、その用途は抗ヘリコバクター・ピロリ薬に限定されるものでないことは当然であるが、抗菌作用、特にヘリコバクター・ピロリに代表されるヘリコバクター属菌に対する強い抗菌活性を有するために、抗菌剤として、上記のようなヘリコバクター・ピロリの感染に起因する

「十二指腸潰瘍、胃潰瘍、胃炎(慢性胃炎を含む)、胃癌など」の予防又は治療に有効である。化合物(1)又はその薬理学的に許容される塩を含有する本発明製剤は、抗菌剤及び抗潰瘍剤として、ヒト等の哺乳動物(例えば、人、犬、猫、サル、ラット、マウス、馬、牛等)に経口的又は非経口的に投与することができ、一般に、経口的な投与が好ましい。経口投与する場合の剤形の例としては、例えば錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。また、非経口投与する場合の剤形としては、例えば注射剤、注入剤、点滴剤、坐剤等があげられる。

【0038】本発明製剤中の化合物(1)またはその塩の含有量は、通常2~85重量%、好ましくは5~70重量%である。化合物(1)又はその塩を上記の剤形に製造する方法としては、当該分野で一般的に用いられている公知の製造方法を適用することができる。また、上記の剤形に製造する場合には、必要に応じて、その剤形に製する際に製剤分野において通常用いられる賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、界面活性剤、懸濁化剤、乳化剤等を適宜、適量含有させて製造することができる。例えば、化合物(1)又はその塩を錠剤に製する場合には、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を含有させて製造することができ、丸剤及び顆粒剤に製する場合には、賦形剤、結合剤、崩壊剤等を含有させて製造することができる。また、散剤及びカプセル剤に製する場合には、賦形剤等を、シロップ剤に製する場合には、甘味剤等を、乳剤及び懸濁剤に製する場合には、懸濁化剤、界面活性剤、乳化剤等を含有させて製造することができる。賦形剤の例としては、乳糖、白糖、ブドウ糖、でんぷん、蔗糖、微結晶セルロース、カンゾウ末、マンニト

ール、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム等があげられる。結合剤の例としては、5～10重量%デンプンのり液、10～20重量%アラビアゴム液又はゼラチン液、1～5重量%トラガント液、カルボキシメチルセルロース液、アルギン酸ナトリウム液、グリセリン等があげられる。崩壊剤の例としては、でんぷん、炭酸カルシウム等があげられる。滑沢剤の例としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、精製タルク等があげられる。甘味剤の例としては、ブドウ糖、果糖、転化糖、ソルビトール、キシリトール、グリセリン、単シロップ等があげられる。界面活性剤の例としては、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリソルベート80、ソルビタンモノ脂肪酸エステル、ステアリン酸ポリオキシシル40等があげられる。懸濁化剤の例としては、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ベントナイト等があげられる。乳化剤の例としては、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、ポリソルベート80等があげられる。更に、化合物(1)又はその塩を上記の剤形に製造する場合には、所望により、製剤分野において通常用いられる着色剤、保存剤、芳香剤、矯味剤、安定剤、粘潤剤等を適宜、適量添加することができる。化合物(1)又はその医薬的に許容される塩を含有する本発明製剤は、安定かつ低毒性で安全に使用することができる。その1日の投与量は患者の状態や体重、化合物の種類、投与経路等によって異なるが、ヘリコバクター・ピロリ感染に起因する胃潰瘍の患者に対して経口投与する場合には、成人(体重約60kg)1日当たりの投与量は有効成分(化合物(1)またはその塩)として1～500mgであり、約10～200mgが好ましい。

【0039】上記の投与量の範囲では、毒性は見られない。また、本発明製剤において化合物(1)又はその塩は、他の抗菌剤及び抗潰瘍剤と併用して投与することもできる。上記、化合物(1)またはその塩と併用することができる他の抗菌剤としては、例えば、ニトロイミダゾール抗生物質(例えば、チニダゾール及びメトロニダゾール)、テトラサイクリン類(例えば、テトラサイクリン、ドキシサイクリン及びミノサイクリン)、ペニシリン類(例えば、アモキシシリン、アンピシリン及びメズロシリン)、セファロsporin類(例えば、セファクロル、セファドロキシル、セファドリッド、セフロキシム、セフロキシムアクセチル、セファレキシム、セフトロキシムプロキシセチル、セフトジキシム及びセフトリアクソン)、カルバペネム類(例えば、イミペネム及びメロペネム)、アミノグリコシド類(例えば、パロモマイシン)、マクロリド抗生物質(例えば、エリスロマイシン、クラリスロマイシン及びアジスロマイシン)、リンコサミド抗生物質(例えば、クリンダマイシン)、リファマイシン類(例えば、リファンピシン)並びにニトロ

フラントインを挙げることができる。また、化合物(1)またはその塩と併用することができる抗潰瘍剤としては、例えばプロトンポンプ阻害剤(例えば、オメプラゾール、ランソプラゾール)またはH₂アンタゴニスト(例えば、ラニチジン、シメチジン及びファモチジン)などが挙げられる。上記他の抗菌剤および抗潰瘍剤は二種以上組合せて用いることができる。この場合上記他の抗菌剤の投与量は経口投与の場合成人1日当たり1～500mg、好ましくは10～200mgであり、上記抗潰瘍剤の投与量は経口投与の場合成人1日当たり0.5～1000mg、好ましくは25～500mgである。

【0040】

【発明の実施の形態】以下に参考例、実施例、実験例、製剤例をあげて本発明を更に詳しく説明するが、これによって本発明が限定されるものではない。なお、パーセント(%)は、特に断りの無い限り、重量/容量パーセントを示す。また、溶媒の混合比率は、特に断りの無い限り、容量比を示す。

¹³C-NMRスペクトルは、JEOL JNM-A500(125MHz)、ブルカーDMX600(150MHz)、ブルカーAC-300(75MHz)スペクトルメーターを用いて測定した。

【0041】

【実施例】参考例1 3-メチル-4-N-カルバモイル-2'-デオキシシチジンの製造

実施例4で得られた培養液(3700リットル)をpH7に調整し、オリバーろ過を行った。ろ液(3850リットル)をpH7に補正後、HP-20(150リットル)、粒状白炭(350リットル)のカラムを順次通過させ、水(1050リットル)で洗浄した。粒状白炭のカラムを0.2N水酸化ナトリウム水(700リットル)、水(1750リットル)で順次洗浄後、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(1050リットル)で溶出した。溶出液をIRC-50(H型、75リットル)、IRA-67(AcO型、60リットル)、IR-120(H型、100リットル)のカラムを順次通過させ、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(200リットル)で洗浄した。IR-120のカラムを水(300リットル)、2Nアンモニア水(182リットル)で順次洗浄後、2Nアンモニア水(118リットル)で溶出した。溶出液を60リットルまで濃縮し、HP-20(6リットル)、IRA-402(AcO型、2リットル)、粒状白炭(10リットル)のカラムを順次通過させ、水(30リットル)で洗浄した。粒状白炭のカラムを5%(V/V)イソプロピルアルコール水(70リットル)で洗浄後、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(40リットル)で溶出した。溶出液を減圧下10リットルまで濃縮し、IR-120(H型、3リットル)のカラムを通過させた。通過液を減圧下500mlまで濃縮し、HP-20(50-100メ

ッシュ、2リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水(4リットル)で洗浄後、3% (V/V) イソプロピルアルコール水(3.6リットル)で溶出した。溶出液を200mlまで濃縮後、2回に分けてSephadex G-10(2.4リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出分画した。目的化合物を含む画分を濃縮後、析出した結晶をろ過して目的化合物(2.47g)を得た。

^{13}C -NMR (D_2O 中、75MHz、 δ ppm) 170.1, 158.4, 154.3, 138.9, 100.0, 89.4, 89.0, 73.3, 64.1, 41.5, 32.4

元素分析値 $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5$ として

実測値; C, 46.72; H, 5.48; N, 19.43

計算値; C, 46.48; H, 5.67; N, 19.71

UVスペクトル: λ_{max} (ϵ)

水中; 226 nm (8,000), 277 nm (12,600)

0.1N塩酸中; 236 nm (8,500), 303 nm (15,900)

0.1N水酸化ナトリウム水中; 278 nm (12,800)

【0042】実施例1

グルコース0.1%, トリアトン0.5%, 酵母エキス0.25%, 寒天1.5%からなる斜面培地上に予め十分に生育したバチルス・エスピーHC-62株の一白金耳を、グルコース2.0%, 可溶性澱粉3.0%, コーン・スチープ・リカー0.3%, 生大豆粉1.0%, ポベプトン0.5%, 酵母エキス0.1%, オート・ミール・アガー0.2%, 塩化ナトリウム0.3%および沈降性炭酸カルシウム0.5%からなる pH7.0の種培養培地500mlを分注滅菌した2L容坂口フラスコに接種して、往復振盪機上で24℃で2日間培養した。この培養液500mlをグルコース2.0%, 可溶性澱粉3.0%, 生大豆粉1.0%, コーン・スチープ・リカー0.3%, 酵母エキス0.1%, ポリベプトン0.5%, 塩化ナトリウム0.3%, 沈降性炭酸カルシウム0.5%, アクトコール0.05%及びシリコン0.05%からなる pH7.0の種培養培地120Lを含む200L容発酵槽に移植し、温度24℃、内圧1.0kg/cm²、通気120L/min、撹拌120rpmの条件下で24時間培養を行なった。この培養液10Lをグルコース0.5%, デキストリン5.0%, 脱脂大豆粉3.5%, 酵母エキス0.5%, 沈降性炭酸カルシウム0.7%, アクトコール0.05%及びシリコン0.05%からなる pH6.5の主培養培地1200Lを含む2000L容発酵槽に移植し、温度24℃、内圧1.0kg/cm²、通気860L/min、撹拌120rpmの条件下で24時間培養を行なった。

【0043】実施例2

実施例1で得られた培養液(1200リットル)をpH7に調整し、オリバーろ過を行った。ろ液(1380リットル)をpH7に補正後、活性炭(230リットル)のカラムクロマトグラフィーに付した。水(460リットル)、0.1N水酸化ナトリウム水(460リットル)、水(1200リットル)で順次洗浄後、30% (V/V) イソプロピルアルコール水(690リットル)で溶出した。溶出液をIRC-50(H型、30リットル)、IRA-67(AcO型、30リットル)のカラムを順次通過させ、30% (V/V) イソプロピルアルコール水(120リットル)で洗浄した。通過液と洗浄液を合わせ、減圧下20リットルまで濃縮し、IR-120(H型、100リットル)のカラムクロマトグラフィーに付した。水洗(300リットル)後、2Nアンモニア水(300リットル)で溶出分画した。HC-62を含む画分を20リットルまで濃縮し、pH7に調整後、HP-20(4リットル)、SP-207(9リットル)のカラムを順次通過させ、水(27リットル)で洗浄した。SP-207のカラムから10% (V/V) イソプロピルアルコール水(27リットル)で溶出し、減圧下700mlまで濃縮した。濃縮液を5℃で1日放置して生じた析出物をろ過により除去し、得られたろ液(1リットル)を水(1リットル)で希釈後、pH7に調整し、粒状白炭(1リットル)のカラムクロマトグラフィーに付した。水(5リットル)、5% (V/V) イソプロピルアルコール水(3リットル)で順次洗浄後、30% (V/V) イソプロピルアルコール水(3リットル)で溶出した。溶出液を190mlまで濃縮後、HP-20(50-100メッシュ、2.5リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水(7.5リットル)、2% (V/V) イソプロピルアルコール水(5リットル)で溶出分画した。HC-62を含む画分を80mlまで濃縮後、Sephadex G-10(2.4リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出分画した。HC-62を含む画分を50mlまで濃縮後、CG-50(H型、1リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出分画した。HC-62を含む画分を濃縮乾固し、粗粉末(4.3g)を得た。得られた粗粉末を4回に分けて分取HPLC〔カラム; YMC-Pack SH-363-15, 0DS(ワイエムシイ社製)、移動相; 2% (V/V) アセトニトリル/0.02Mリン酸緩衝液(pH6.3)、流速; 12ml/分〕に付し、溶出容量380-600mlの画分を集め、減圧下300mlまで濃縮した。濃縮液をpH7に調整後、粒状白炭(50ml)のカラムクロマトグラフィーに付し、水洗(150ml)後、30% (V/V) イソプロピルアルコール水(150ml)で溶出した。溶出液を10mlまで濃縮後、CG-50(H型、200ml)のカラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出分画した。化合物1(HC-62)を含む画分を濃縮後、凍結乾燥して化合物1(1.64g)を白色粉末として得た。

【0044】実施例3

実施例1で得られた培養液(1200リットル)をpH7に調整し、オリバーろ過を行った。ろ液(1430リットル)をpH7に補正後、HP-20(50リットル)、水(1200リットル)で順次洗浄後、30% (V/V) イソプロピルアルコール水(690リットル)で溶出した。溶出液をIRC-50(H型、30リットル)、IRA-67(AcO型、30リットル)のカラムを順次通過させ、30% (V/V) イソプロピルアルコール水(120リットル)で洗浄した。通過液と洗浄液を合わせ、減圧下20リットルまで濃縮し、IR-120(H型、100リットル)のカラムクロマトグラフィーに付した。水洗(300リットル)後、2Nアンモニア水(300リットル)で溶出分画した。HC-62を含む画分を20リットルまで濃縮し、pH7に調整後、HP-20(4リットル)、SP-207(9リットル)のカラムを順次通過させ、水(27リットル)で洗浄した。SP-207のカラムから10% (V/V) イソプロピルアルコール水(27リットル)で溶出し、減圧下700mlまで濃縮した。濃縮液を5℃で1日放置して生じた析出物をろ過により除去し、得られたろ液(1リットル)を水(1リットル)で希釈後、pH7に調整し、粒状白炭(1リットル)のカラムクロマトグラフィーに付した。水(5リットル)、5% (V/V) イソプロピルアルコール水(3リットル)で順次洗浄後、30% (V/V) イソプロピルアルコール水(3リットル)で溶出した。溶出液を190mlまで濃縮後、HP-20(50-100メッシュ、2.5リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水(7.5リットル)、2% (V/V) イソプロピルアルコール水(5リットル)で溶出分画した。HC-62を含む画分を80mlまで濃縮後、Sephadex G-10(2.4リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出分画した。HC-62を含む画分を50mlまで濃縮後、CG-50(H型、1リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出分画した。HC-62を含む画分を濃縮乾固し、粗粉末(4.3g)を得た。得られた粗粉末を4回に分けて分取HPLC〔カラム; YMC-Pack SH-363-15, 0DS(ワイエムシイ社製)、移動相; 2% (V/V) アセトニトリル/0.02Mリン酸緩衝液(pH6.3)、流速; 12ml/分〕に付し、溶出容量380-600mlの画分を集め、減圧下300mlまで濃縮した。濃縮液をpH7に調整後、粒状白炭(50ml)のカラムクロマトグラフィーに付し、水洗(150ml)後、30% (V/V) イソプロピルアルコール水(150ml)で溶出した。溶出液を10mlまで濃縮後、CG-50(H型、200ml)のカラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出分画した。化合物1(HC-62)を含む画分を濃縮後、凍結乾燥して化合物1(1.64g)を白色粉末として得た。

【0044】実施例3

実施例1で得られた培養液(1200リットル)をpH7に調整し、オリバーろ過を行った。ろ液(1430リットル)をpH7に補正後、HP-20(50リットル)

ル)、粒状白炭(220リットル)のカラムを順次通過させ、水(660リットル)で洗浄した。粒状白炭のカラムを0.2N水酸化ナトリウム水(440リットル)、水(1100リットル)で順次洗浄後、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(660リットル)で溶出した。溶出液をIRC-50(H型、25リットル)、IRA-67(AcO型、30リットル)、IR-120(H型、50リットル)のカラムを順次通過させ、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(120リットル)で洗浄した。IR-120のカラムを水(150リットル)、2Nアンモニア水(70リットル)で順次洗浄後、2Nアンモニア水(80リットル)で溶出した。溶出液を13リットルまで濃縮し、HP-20(2リットル)、粒状白炭(3リットル)のカラムを順次通過させ、水(9リットル)で洗浄した。粒状白炭のカラムを5%(V/V)イソプロピルアルコール水(6リットル)で洗浄後、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(9リットル)で溶出した。溶出液を減圧下200mlまで濃縮し、生じた析出物をろ過により除去した。得られたろ液をHP-20(50-100メッシュ、2リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水(6リットル)で溶出分画した。化合物1および化合物2を含む画分を120mlまで濃縮後、2回に分けてSephadex G-10(2.4リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出分画した。化合物1および化合物2を含む画分を200mlまで濃縮後、HP-20(50-100メッシュ、2リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水(6リットル)、3%(V/V)イソプロピルアルコール水(6リットル)で溶出分画した。化合物1および化合物2を含む画分を濃縮後、凍結乾燥して得られた粉末(8.2g)をCG-50(H型、5.00ml)のカラムクロマトグラフィーに付し、水(3リットル)で溶出分画した。化合物1および化合物2を含む画分を濃縮後、凍結乾燥して粗粉末(2.28g)を得た。得られた粗粉末を5回に分けて分取HPLC(カラム; YMC-Pack SH-363-15, ODS(ワイエムシ社製)、移動相; 1.5%(V/V)アセトニトリル/0.02Mリン酸緩衝液(pH3.0)、流速; 12ml/分)に付し、化合物1を含む画分および化合物2を含む画分を集めた。化合物1を含む画分を減圧下300mlまで濃縮し、pH8に調整後、粒状白炭(30ml)のカラムクロマトグラフィーに付し、水洗(90ml)後、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(100ml)で溶出した。溶出液を濃縮後、凍結乾燥して化合物1(813mg)を白色粉末として得た。化合物2を含む画分も同様に処理して化合物2(550mg)を白色粉末として得た。

【0045】化合物2

- 1) 外観: 白色粉末
- 2) 比旋光度: -22° ($c=0.56$ 、水、27°C)

3) 分子量: FAB-マスマスペクトル; m/z 835 ($M + H$)⁺

4) 元素分析値: (%) (水分3.5モルとして計算)

実測値; C, 38.99; H, 6.16; N, 18.66; P, 3.71

計算値; C, 38.80; H, 6.06; N, 18.72; P, 3.45

5) 分子式: $C_{29}H_{47}N_{12}O_{15}P$

6) UVスペクトル: λ_{max} (ϵ)

水中; 223 nm (10,200), 278 nm (13,400)

0.1N塩酸中; 236 nm (8,800), 304 nm (16,700)

0.1N水酸化ナトリウム水中; 278 nm (13,300)

7) IRスペクトル: KBr錠剤中、主な吸収を示す(波数、 cm^{-1})。

3410, 1660, 1580, 1470, 1300, 1230, 1080

8) ^{13}C -NMRスペクトル(図3): 重水中、以下のシグナルが認められる。

(150 MHz、 δ ppm)

180.6, 180.5, 179.7, 175.8, 175.6, 172.3, 170.2, 1

58.3, 154.4, 139.0, 100.3, 89.0, 88.3, 88.2, 74.0,

68.1, 68.1, 63.9, 59.2, 59.2, 56.1, 56.0, 55.2, 4

1.8, 33.8, 33.7, 32.9, 32.5, 29.8, 29.8, 29.4

9) アミノ酸分析: 6N塩酸中、110°Cで24時間加水分解後、分析。

グルタミン酸(3モル)、セリン(1モル)

10) 呈色反応:

陽性; ニンヒドリン、リンモリブデン酸反応

陰性; エールリッヒ、坂口反応

11) 溶解性:

可溶; 水、ジメチルスルホキシド

難溶; ジエチルエーテル、アセトン

12) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC):

カラム; YMC-Pack ODS-A, A-312, 150 x 6.0 mm (ワイエムシ社製)

移動相; 4%(V/V)アセトニトリル/0.05Mリン酸緩衝液(pH3)

流速; 1.0ml/分

検出法; UV吸収、214nm

保持時間; 5.5分

【0046】実施例4

グルコース0.1%, トリアトン0.5%, 酵母エキス0.25%, 寒天1.5%からなる斜面培地上に予め十分に生育したバチルス・エスピーHC-62株の白金耳を、グルコース2.0%, 可溶性澱粉3.0%, コーン・スチープ・リカー0.3%, 生大豆粉1.0%, ポベプトン0.5%, 酵母エキス0.1%, オート・ミール・アガー0.2%, 塩化ナトリウム0.3%および沈降性炭酸カルシウム0.5%からなる pH7.0の種培養培地500mlを分注滅菌した2L容坂口フラスコに接種して、往復振盪機上で24°Cで1日間培養した。この培養液500mlをグルコース2.0%, 可溶性澱粉3.0%, 生大豆粉1.0%, コーン・スチープ・リカー0.3%, 酵母エキ

ス0.1%, ポリペプトン0.5%, 塩化ナトリウム0.3%, 沈降性炭酸カルシウム0.5%, アクトール0.05%及びシリコン0.05%からなる pH7.0の種培養培地120Lを含む200L容発酵槽に移植し、温度24℃、内圧1.0kg/cm²、通気120L/min、撹拌120rpmの条件下で24時間培養を行なった。この培養液12Lをグルコース0.5%, 脱脂大豆粉3.5%, 酵母エキス0.2%, 沈降性炭酸カルシウム0.3%, アクトール0.05%及びシリコン0.05%からなる pH6.8の主培養培地3600Lを含む6000L容発酵槽に移植し、温度24℃、内圧1.0kg/cm²、通気2880L/min、撹拌120rpmの条件下で24時間培養を行なった。

【0047】実施例5

実施例4で得られた培養液(3700リットル)をpH7に調整し、オリバーろ過を行った。ろ液(3520リットル)をpH7に補正後、HP-20(150リットル)、粒状白炭(350リットル)のカラムを順次通過させ、水(1050リットル)で洗浄した。粒状白炭のカラムを0.2N水酸化ナトリウム水(700リットル)、水(1750リットル)で順次洗浄後、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(1050リットル)で溶出した。溶出液をIRC-50(H型、75リットル)、IRA-67(AcO型、60リットル)、IR-120(H型、100リットル)のカラムを順次通過させ、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(200リットル)で洗浄した。IR-120のカラムを水(300リットル)、2Nアンモニア水(214リットル)で順次洗浄後、2Nアンモニア水(86リットル)で溶出した。溶出液を41リットルまで濃縮し、HP-20(6リットル)、粒状白炭(10リットル)のカラムを順次通過させ、水(30リットル)で洗浄した。粒状白炭のカラムを5%(V/V)イソプロピルアルコール水(70リットル)で洗浄後、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(50リットル)で溶出した。溶出液を減圧下500mlまで濃縮し、HP-20(50-100メッシュ、2.5リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水(6リットル)で溶出分画した。化合物3を含む画分をpH5に補正後、SP-207(1リットル)のカラムクロマトグラフィーに付し、水(400ml)で洗浄後、水(1リットル)、5%(V/V)イソプロピルアルコール水(1.2リットル)で順次溶出した。溶出液を濃縮後、凍結乾燥して得られた粉末(37.4g)をIRA-402(AcO型、400ml)のカラムクロマトグラフィーに付し、水洗(1.2リットル)後、2M食塩水(800ml)で溶出した。溶出液をpH5に調整後、粒状白炭(150ml)のカラムクロマトグラフィーに付し、水洗(450ml)後、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(450ml)で溶出した。溶出液を濃縮後、凍結乾燥して粗粉末(5.

6g)を得た。得られた粗粉末を5回に分けて分取HPLC〔カラム; YMC-Pack SH-363-15, ODS (ワイエムシ社製)、移動相; 1.5%(V/V)アセトニトリル/0.025Mリン酸緩衝液(pH4.5)、流速; 12ml/分〕に付し、化合物3を含む画分を集め濃縮した。濃縮液をpH5に調整後、粒状白炭(50ml)のカラムクロマトグラフィーに付し、水洗(150ml)後、30%(V/V)イソプロピルアルコール水(150ml)で溶出した。溶出液を濃縮後、凍結乾燥して化合物3を含有する粗粉末(1.3g)を得た。得られた粗粉末を2回に分けて再度、分取HPLC〔カラム; YMC-Pack SH-363-15, ODS (ワイエムシ社製)、移動相; 1.5%(V/V)アセトニトリル/0.025Mリン酸緩衝液(pH3.0)、流速; 12ml/分〕に付し、化合物3を含む画分を集め濃縮した。濃縮液をpH5に調整後、粒状白炭(25ml)のカラムクロマトグラフィーに付し、水洗(75ml)後、50%(V/V)イソプロピルアルコール水(100ml)で溶出した。溶出液を濃縮後、凍結乾燥して化合物3(512mg)を白色粉末として得た。

【0048】化合物3

- 1) 外観: 白色粉末
- 2) 比旋光度: -2° ($c=0.54$, 水, 27℃)
- 3) 分子量: FAB-マスマスペクトル; m/z 708 ($M + H$)⁺
- 4) 元素分析値: (%) (水分2モルとして計算)
実測値; C, 38.62; H, 5.47; N, 16.77
計算値; C, 38.76; H, 5.69; N, 16.95
- 5) 分子式: $C_{24}H_{38}N_9O_{14}$ P
- 6) UVスペクトル: λ_{max} (ϵ)
水中; 222 nm (8,800), 278 nm (12,300)
0.1N塩酸中; 233 nm (8,200), 304 nm (15,500)
0.1N水酸化ナトリウム水中; 278 nm (12,400)
- 7) IRスペクトル: KBr錠剤中、主な吸収を示す(波数, cm^{-1})。
3430, 1660, 1580, 1470, 1300, 1230, 1080
- 8) ¹³C-NMRスペクトル(図4): 重水中、以下のシグナルが認められる。
(75 MHz, δ ppm)
181.2, 180.6, 175.7, 175.7, 175.5, 172.4, 169.8, 158.5, 154.3, 139.3, 100.3, 89.1, 88.4, 88.3, 74.0, 68.2, 68.1, 63.9, 59.4, 59.3, 56.2, 55.5, 41.8, 33.9, 33.8, 32.6, 29.9, 29.6
- 9) アミノ酸分析: 6N塩酸中、110℃で24時間加水分解後、分析。
グルタミン酸(2モル)、セリン(1モル)
- 10) 呈色反応:
陽性; ニンヒドリン、リンモリブデン酸反応
陰性; エールリッヒ、坂口反応
- 11) 溶解性:
可溶; 水、ジメチルスルホキシド

難溶；ジエチルエーテル、アセトン

12) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) :

カラム；YMC-Pack ODS-A, A-312, 150 x 6.0 mm (ワイエムシイ社製)

移動相；4% (V/V) アセトニトリル/0.05Mリン酸緩衝液 (pH 3)

流速；1.0ml/分

検出法；UV吸収、214nm

保持時間；5.4分

【0049】実施例6

化合物1 (200mg) をリン酸緩衝液 (40mM, pH 7, 40ml) に溶解し、ロイシンアミノペプチダーゼ M (50ユニット, シグマ社製) を添加し、37℃で1時間反応させた。反応液を粒状白炭 (10ml) のカラムクロマトグラフィーに付した。水 (30ml) で洗浄後、50% (V/V) イソプロピルアルコール水 (40ml) で溶出し、溶出液を濃縮した。得られた濃縮液をC G-50 (H型, 50ml) のカラムクロマトグラフィーに付し、水で溶出分画した。70-115mlの溶出区分を濃縮後凍結乾燥し、化合物4 (57mg) を白色粉末として得た。

化合物4

^{13}C -NMR (D_2O 中、75MHz、 δ ppm) (図5)

172.2, 170.2, 158.4, 154.4, 139.0, 100.2, 89.0, 88.1, 88.0, 73.8, 68.1, 68.1, 62.9, 58.4, 58.3, 41.7, 32.4

元素分析値 $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_9\text{P} \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ として

実測値；C, 34.16；H, 5.72；N, 16.77

計算値；C, 33.94；H, 5.70；N, 16.96

FAB-マスマスペクトル； m/z 451 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

【0050】実施例7

化合物1 (500mg) をリン酸緩衝液 (40mM, pH 8, 50ml) に溶解し、ロイシンアミノペプチダーゼ C (150ユニット, シグマ社製) を添加し、28℃で1時間反応させた後、エチルアルコール (500ml) を添加し反応を停止した。反応停止液を濃縮しエチルアルコールを留去した後、粒状白炭 (20ml) のカラムクロマトグラフィーに付した。水 (60ml) で洗浄後、30% (V/V) イソプロピルアルコール水 (80ml) で溶出し、溶出液を濃縮した。得られた濃縮液を分取HPLC [カラム；YMC-Pack SH-363-15, ODS (ワイエムシイ社製)、移動相；1% (V/V) アセトニトリル/0.025Mリン酸緩衝液 (pH 3、流速；1.2ml/分)] に付し、溶出容量520-600mlの画分を集めpH 7に調整後、減圧下40mlまで濃縮した。濃縮液を粒状白炭 (10ml) のカラムクロマトグラフィーに付し、水洗

(30ml) 後、30% (V/V) イソプロピルアルコール水 (40ml) で溶出した。溶出液を濃縮後、凍結乾燥して化合物5 (103mg) を白色粉末として得た。

化合物5

^{13}C -NMR (D_2O 、75MHz、 δ ppm) (図6) 180.4, 175.7, 175.4, 170.2, 158.3, 154.3, 139.0, 100.2, 89.0, 88.3, 88.2, 74.0, 68.1, 68.0, 63.9, 59.2, 59.1, 55.9, 41.7, 33.4, 32.4, 31.1

FAB-マスマスペクトル； m/z 579 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

【0051】実験例1 in vitro 抗菌試験：

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) に対する in vitro 抗菌活性試験

被験菌として、ヘリコバクター・ピロリ (NCTC 11637) 菌を使用し、化合物1の抗菌活性は以下の方法 [寒天希釈 (Agar Dilution) 法] によって測定した。化合物1をジメチルスルホキシドに溶解し、滅菌蒸留水で2倍ずつ段階的に希釈することによって被験サンプルを調製した。培地として7%馬血液加 *Brucella agar* を使用し、調製した被験サンプル2ミリリットルを、各々7%馬血液加 *Brucella agar* 18ミリリットルと混和することによって、測定用平板を作製した。ヘリコバクター・ピロリ菌は、2.5%牛胎児血清添加 *Brucella* labroth 培地を使用して、CampyPak™ (BBL® Beckton Dickinson Microbiology Systems) を挿入したガスバックジャー中で、37℃、20時間振盪培養して、種菌液とした。2.5%牛胎児血清添加 *Brucella* broth 培地を用いて約 10^6 CFU/ml に調整した菌液5マイクロリットルを、各々の測定用平板に接種し、CampyPak™ と水を含ませた脱脂綿を挿入したガスバックジャー中で、37℃、4日間培養した。培養後、菌株の発育を肉眼で観察し、菌株の発育が観察されない最低濃度を該被験化合物のMIC値 (最小発育阻止濃度) とした。化合物1は0.025 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) のMIC値を示した。

【0052】実験例2 in vivo 抗菌活性試験：マウス (Crj: ICR、雄、5週齢) を20時間絶食させた後、ヘリコバクター・ピロリ TN2F4 をマウス当たり $10^{7.79}$ CFU 胃内に接種した。感染1日後から0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁した被験化合物の1、3、10、30、50mg/kg を1日朝夕2回、2日間経口投与した。最終投与翌日に感染マウスの胃を摘出して破碎し、その10倍希釈系列を活性炭添加変法 Skirrow 培地に接種して微好気条件下37℃で4日間培養を行い、菌の発育の有無をもとに除菌効果を求めた。結果を [表1] に示す。なお、細菌数は平均±標準偏差で表し、対照群に対して Dunnett 検定を行った。[表1] において**は $P < 0.01$ を示す。

【表1】

検体	投与用量 (mg/kg)	除菌率 (%)	細菌検査 (Log CFU/胃壁)
対照 (0.5%メチルセルロース溶液)		0/4 (0)	4.36 ± 0.32
化合物1 (HC-62)	1	0/4 (0)	2.48 ± 0.98 **
	3	0/4 (0)	2.75 ± 0.44 **
	10	0/4 (0)	1.77 ± 0.33 **
	30	2/4 (50)	1.50 ± 0.39 **
	50	4/4 (100)	—

〔表1〕に示す通り、化合物1 (HC-62) は1 mg/kg以上で用量依存性のあるマウス胃内菌数低減効果を発現し、30 mg/kgで50%、50 mg/kgでは100%の除菌率が達成された。従って、ヘリコバクター・ピロリ感染に起因する胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃癌の予防および治療に本発明製剤が有効であることが分かる。

【0053】製剤例

本発明の化合物1 またはその塩を有効成分として含有してなる、ヘリコバクター・ピロリ感染症治療剤として使用する場合、次のような処方によって製造することができる。

1. カプセル剤

- | | |
|------------------|-------|
| (1) 化合物1 | 100mg |
| (2) ラクトース | 90mg |
| (3) 微結晶セルロース | 70mg |
| (4) ステアリン酸マグネシウム | 10mg |

1カプセル 270mg

(1)、(2)と(3)の全量及び(4)の1/2を混和した後、顆粒化する。これに残りの(4)を加えて全体をゼラチンカプセルに封入する。

2. 錠剤

- | | |
|------------------|-------|
| (1) 化合物1 | 100mg |
| (2) ラクトース | 35mg |
| (3) コーンスターチ | 150mg |
| (4) 微結晶セルロース | 30mg |
| (5) ステアリン酸マグネシウム | 5mg |

1錠 320mg

(1)、(2)と(3)の全量及び(4)の2/3及び(5)の1/2を混和した後、顆粒化する。これに残りの(4)及び(5)をこの顆粒に加えて錠剤に加圧成型する。

【0054】

〔発明の効果〕本発明の化合物(1)は、ヘリコバクター・ピロリに代表されるヘリコバクター属菌に対して極めて特異的な強い抗菌活性を有する。従って、本発明の

化合物又はその塩を使用すれば、ヘリコバクター属菌(特にヘリコバクター・ピロリ)に対する従来の抗菌剤の有効量より非常に少ない投与量で望ましい抗ヘリコバクター・ピロリ剤としての効果を得ることができる。化合物(1)は、ヘリコバクター属菌に起因する十二指腸潰瘍、胃潰瘍、慢性胃炎、胃癌等の各種の疾患の予防又は治療に有効であり、ヘリコバクター・ピロリは潰瘍を再発させる大きな原因でもあるため、潰瘍の再発防止にも有効である。また、化合物(1)は、スタフィロコッカス属またはバチルス属等のグラム陽性菌、及びエシェリヒア属、シウドモナス属、プロテウス属、クレブシエラ属、セラチア属、サルモネラ属、シテロバクター属及びアルカリゲネス属などのようなグラム陰性菌に対する抗菌作用を示さない。従って、本発明の一般式(1)で表される化合物又はその塩は、ヘリコバクター属細菌の疾患の予防又は治療に選択的に有効であり、その他の細菌及び真菌類への影響が極めて少なく、副作用のない安全な薬剤として使用しうる。化合物(1)は、安定かつ低毒性である。即ち、本発明は、副作用のない優れた抗ヘリコバクター・ピロリ剤を提供するものである。

【0055】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は実施例2で得られた化合物1 (HC-62) のIRスペクトルを示す。

【図2】図2は実施例2で得られた化合物1 (HC-62) の¹³C-NMRスペクトルを示す。

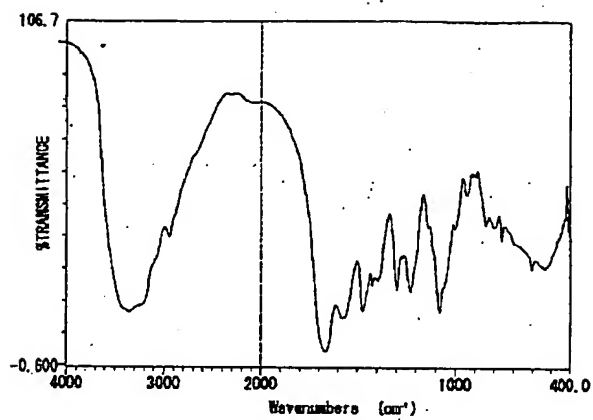
【図3】図3は実施例3で得られた化合物2の¹³C-NMRスペクトルを示す。

【図4】図4は実施例5で得られた化合物3の¹³C-NMRスペクトルを示す。

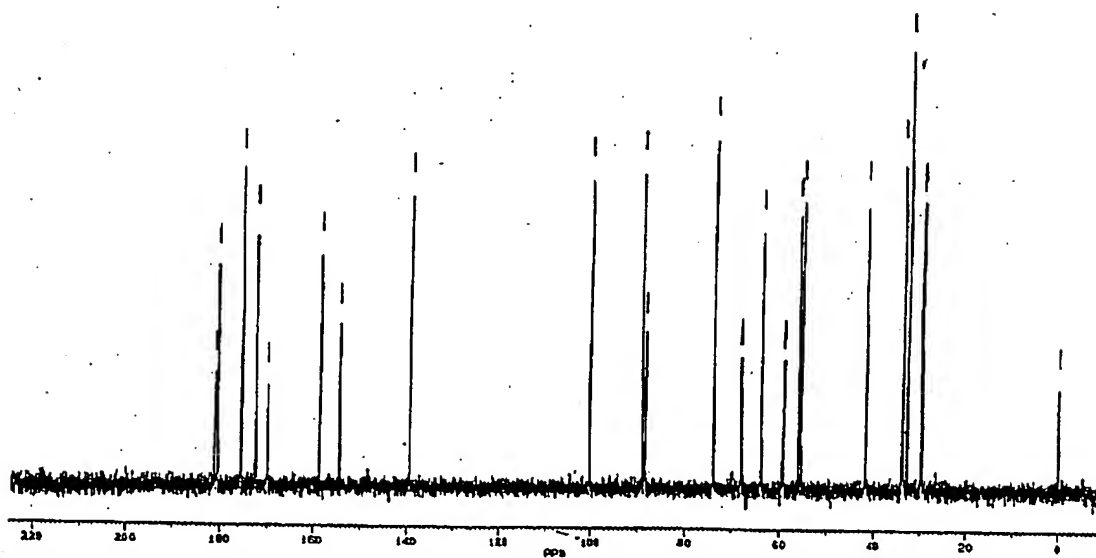
【図5】図5は実施例6で得られた化合物4の¹³C-NMRスペクトルを示す。

【図6】図6は実施例7で得られた化合物5の¹³C-NMRスペクトルを示す。

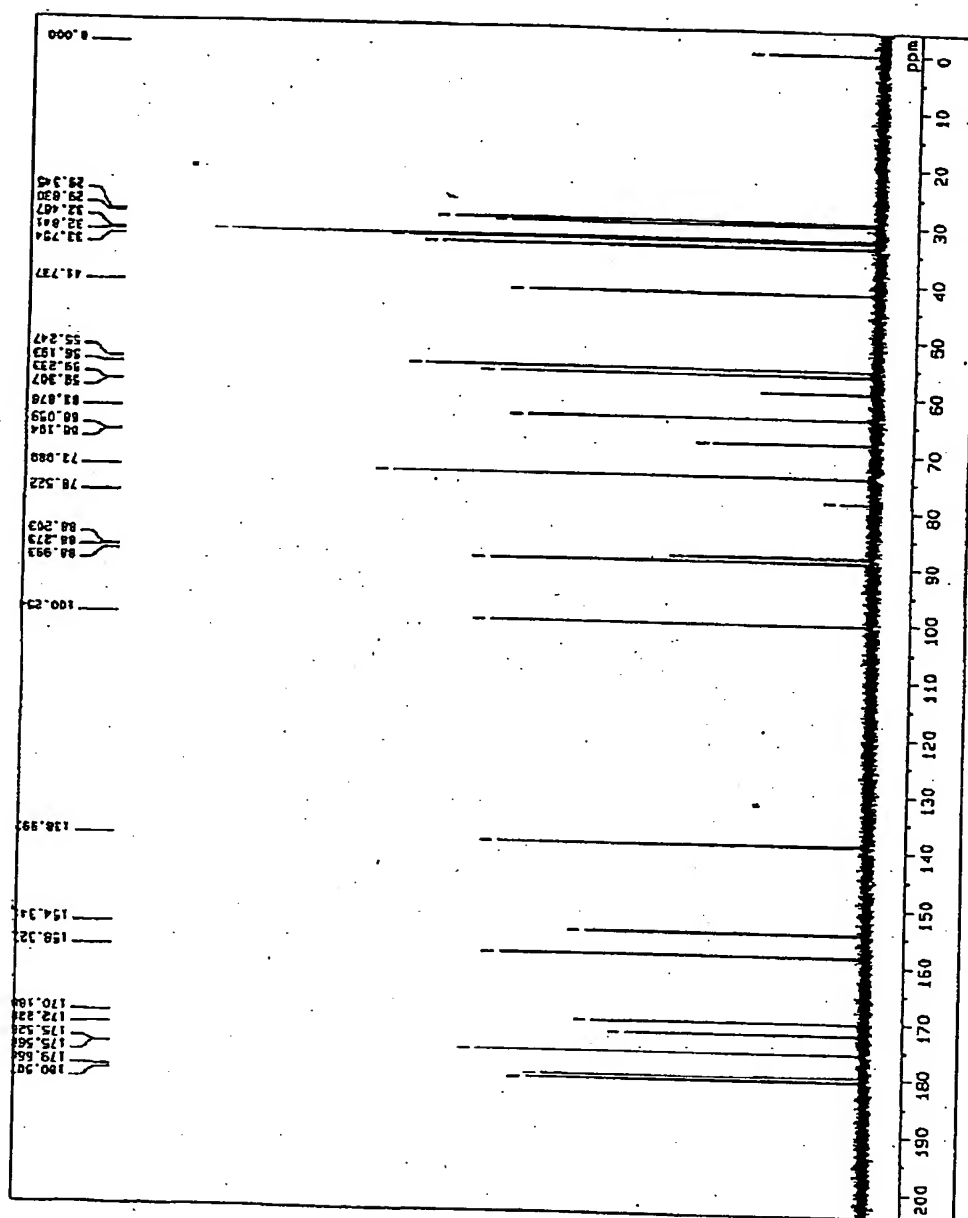
【図1】



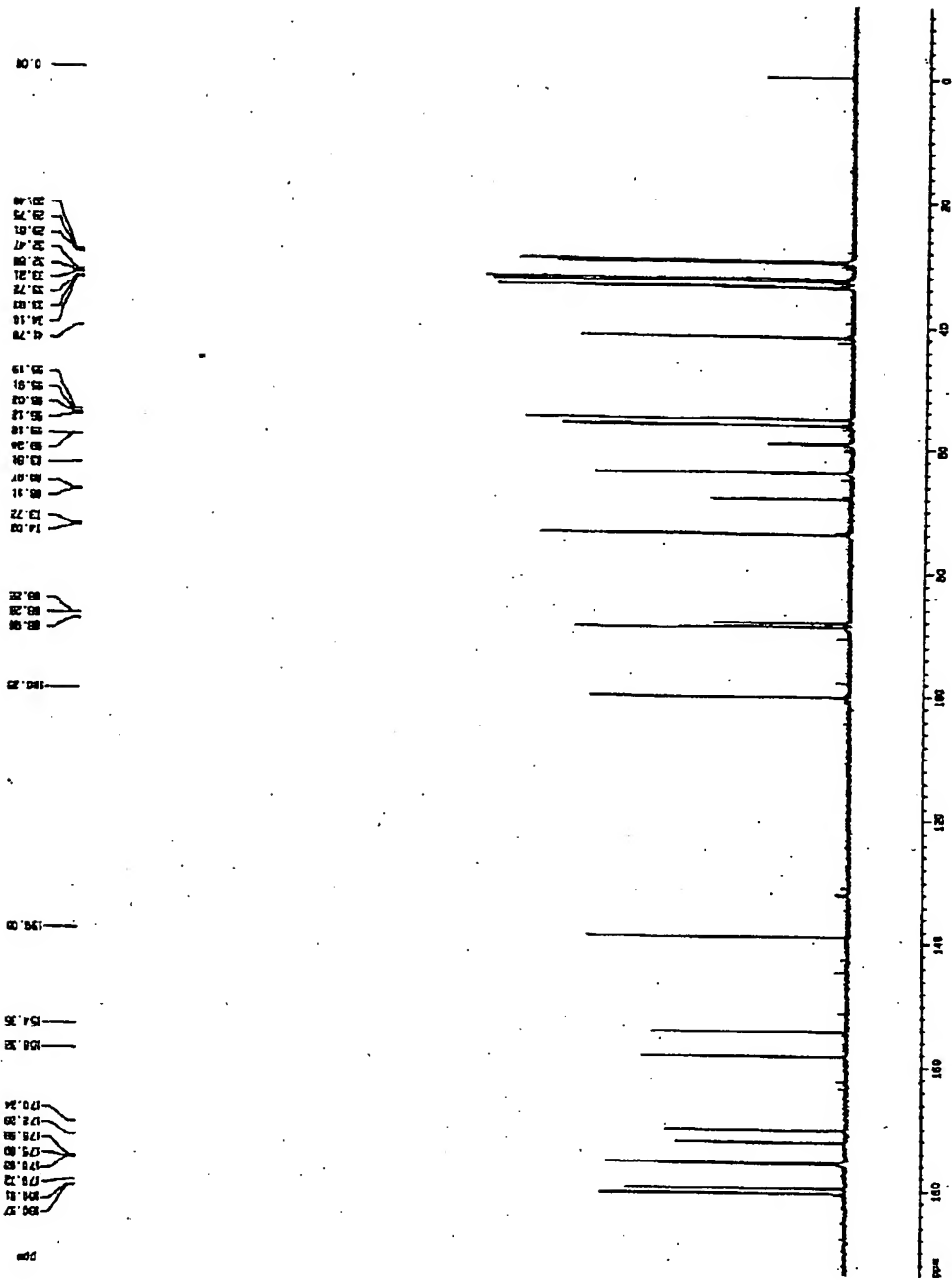
【図4】



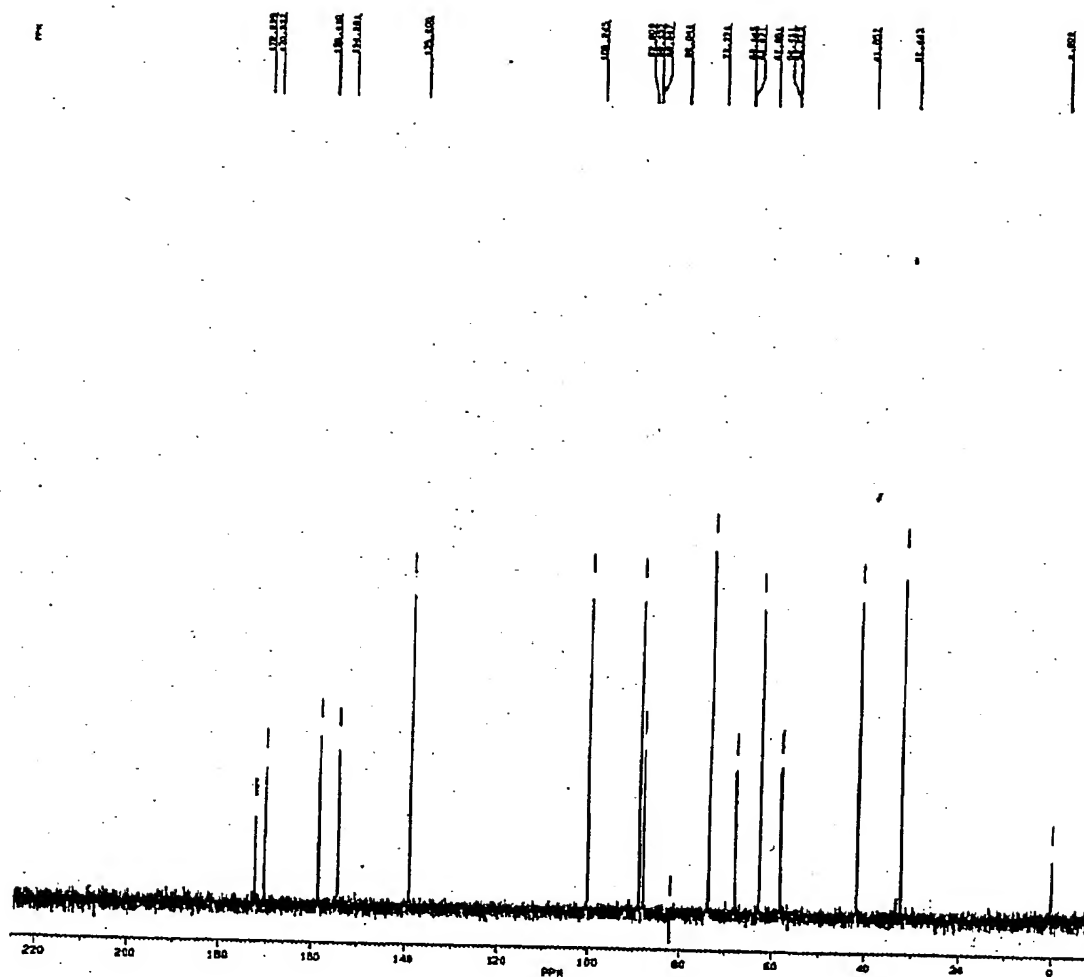
【図2】



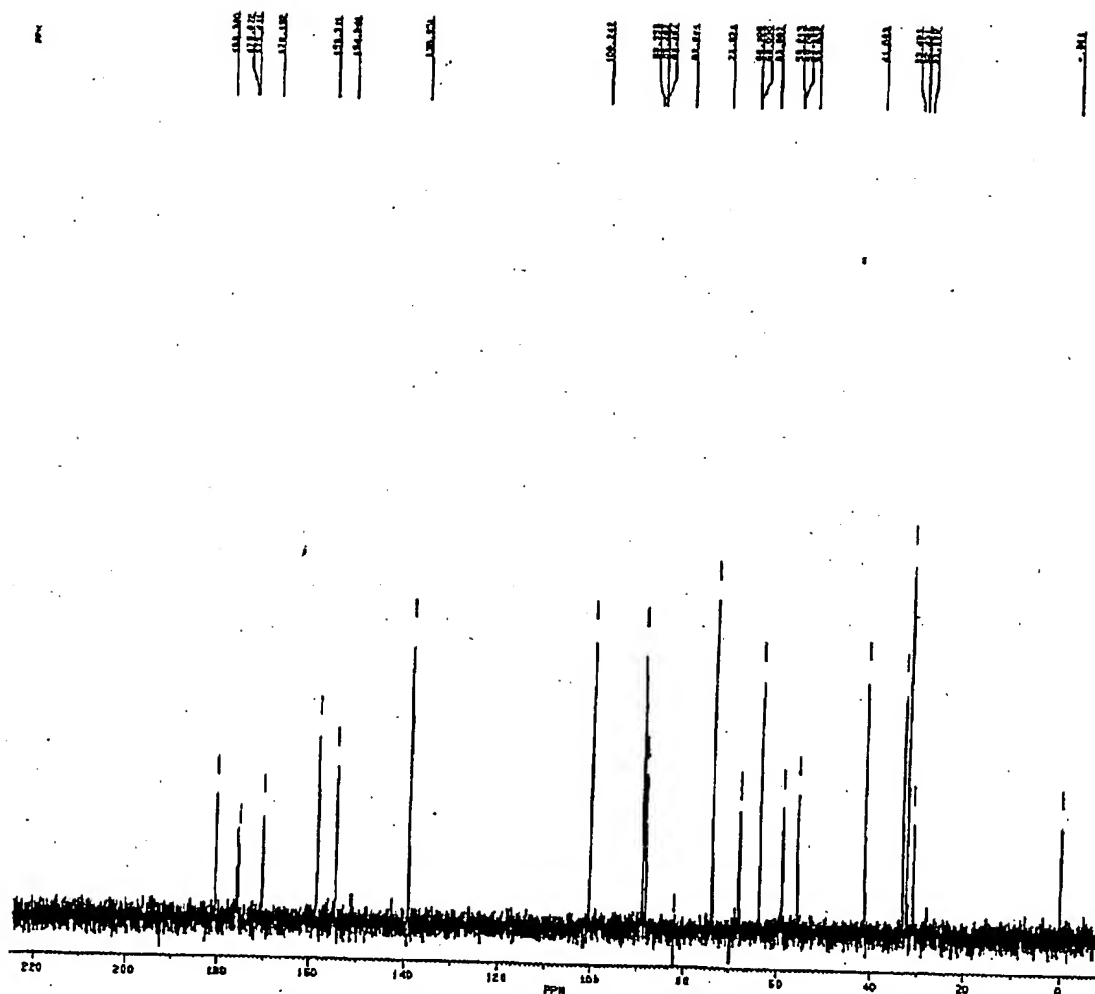
【図3】



【図5】



【図6】



THIS PAGE BLANK (USPTO)